

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle
Pathologie der Bundeswehr, Mainz
(Leiter: Prof. Dr. H.G. FASSBENDER)

Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber nach Gabe eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von
SETIADI HERMAWAN
aus Bandung/Indonesien

1980

Mainz 1977

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle
Pathologie der Bundeswehr, Mainz
(Leiter: Prof. Dr. H. G. FASSBENDER)

Untersuchungen an der isoliert
perfundierten Rattenleber nach
Gabe eines spezifischen cutanen
Verbrennungstoxins.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von

Setiadi HERMAWAN

aus Bandung/Indonesien

Mainz 1977

Dekan : Professor Dr. H. Leithoff

1. Gutachter : Professor Dr. H. G. Fassbender

2. Gutachter : Professor Dr. R. Frey

Tag der mündlichen Prüfung : 19. März 1980



Herrn Prof. Dr. H. G. Fassbender möchte ich für die Überlassung des Themas und für seine freundlichen Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit herzlich danken.

Herrn Dr. med. J. Schölmerich danke ich für die wertvolle Hilfe bei allen technischen und wissenschaftlichen Fragen und seine stets großzügige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau B. Heuft und allen Mitarbeitern des Instituts für die große Hilfe während der Durchführung der Versuche und für ihre exakten Messungen.

Das bei dem Versuch verwendete Verbrennungstoxin wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Dr. K. Schmidt von der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546305_0089

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. EINLEITUNG	
1. Geschichtlicher Rückblick	1
2. Bisherige Untersuchungen	4
B. MATERIAL	7
C. METHODEN	
1. Toxin	8
2. Vorbehandlung	10
3. Präparation der Leber	10
4. Perfusion	12
5. Probenaufbereitung	15
6. Meßmethoden	17
7. Ergebnisverwertung	22
8. Statistische Verfahren	23
D. ERGEBNISSE	
1. Allgemeine Ergebnisse	25
2. Laktat + Pyruvataufnahme	27
3. Glukoseausschüttung	29
4. <u>Laktat + Pyruvat</u> Glukose	31
5. Harnstoffbildung	32
6. Ketonkörperbildung	34
7. Verhalten der Redoxquotienten	36
8. Enzymaustritt	39
9. Zusammenfassung der Ergebnisse	41
E. DISKUSSION	44
F. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS	54
G. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	56
H. LITERATUR	57

A. EINLEITUNG

1. Geschichtlicher Rückblick.

Nach KERNAHAN (27) wurde in den letzten 10 Jahren mit Ausnahme der Krebsforschung auf keinem medizinischen Gebiet aktiver als an den Problemen der Verbrennung gearbeitet.

Die Verbrennung hat besonders universelle Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Diese pathophysiologischen Störungen nach ausgedehnter Verbrennung führten zum Begriff der Verbrennungskrankheit. Die bedeutendsten Auswirkungen schwerer Verbrennung sind der Blutverlust und bakterielle Infektionen. Durch die rechtzeitige, adäquate Behandlung der primären Schockphase und der Frühinfektionen bei Verbrennungen konnte die mittlere Überlebenszeit der schwerverbrannten Patienten verlängert werden. Durch intensive Behandlung konnte die Mortalität deutlich gesenkt werden (44). Dagegen ging die Spätletalität bei drittgradigen Verbrennungen von über 50% der Körperoberfläche nicht wesentlich zurück (45,46).

Eine toxische Wirkung von Serum verbrannter Tiere wurde 1876 von AVDAKOFF (1) erstmals beschrieben. Seitdem sind zahlreiche Versuche zur Isolierung solcher toxischen Substanzen aus verbrannten Gewebsbestandteilen sowie aus Blutserum durchgeführt worden. Der Begriff "Verbrennungstoxin" kam auf und wurde immer wieder von Klinikern und Forschern diskutiert. Zweifellos gibt es gerade bei der Verbrennungskrankheit noch zahlreiche ungelöste Probleme.

1948 beschrieb GREUER (21) die toxische Wirkung von Eiweißabbauprodukten, die aus verbrannter Haut von Ratten gewonnen wurden.

ROSENTHAL (48) 1959 und BURRI et al. (12) 1964 konnten zeigen, daß Extrakt aus in vitro verbrannter Haut bei

Mäusen zentralnervöse Störungen hervorruft. Diese neurotoxische Wirkung wurde in ähnlicher Weise auch von FOX (19) 1964 nach Gabe von toxischen Hautextrakten an Mäusen beobachtet.

SEVITT (63) hat schon vor Jahrzehnten postuliert, daß eine durch thermische Energie entstehende toxische Substanz für den letalen Ausgang von schweren Verbrennungen ganz oder partiell verantwortlich sei.

FEODOROV (17) 1962 führte im Tierversuch und am Menschen die Behandlung mit Rekonvaleszentenserum ein, d.h. von Personen, die eine schwere Verbrennung überstanden hatten.

Die Hypothese, daß durch Hitzeeinwirkung eine oder mehrere toxische Substanzen in der Haut entstehen, die direkt oder durch allgemeine Resistenzverminderung zum Tode führen, wurde von ROSENTHAL 1966 (49) und von SHUN-SCHINELLA et al. (64) 1968 aufgestellt. Es gelang aber nicht, eine bestimmte Substanz, die den Vorstellungen von einem Verbrennungstoxin entsprochen hätte, zu isolieren und zu charakterisieren (3, 23).

Bei Bemühungen um die Reindarstellung des Toxins gelang es SCHOENENBERGER (56) 1969 schließlich, aus der Haut keimfreier Mäuse in vitro nach Anwendung kontrollierter thermischer Energie von 250°C für 15 sec bei 500 g/cm^2 einen toxischen Lipid-Protein-Komplex zu isolieren. Er ist ein Polymerisations-Produkt einer in der natürlichen Haut vorkommenden, nicht toxischen Vorstufe („Nativ“), die ebenfalls isoliert werden konnte (14, 58, 59).

Das Isolierungsverfahren wurde unter sterilen, kontrollierten Bedingungen durchgeführt und die Toxizität beider Produkte ebenfalls im Isolator an sterilen Empfänger-mäusen getestet. Das isolierte Produkt aus verbrannter

Haut zeigte eine absolut letale Wirkung, das Nativ dagegen nicht (57,60).

Bakterien als Ursache für die Toxinbildung und die toxische Aktivität wurden damit ausgeschlossen. Eine Identität mit bakteriellen Endotoxin wurde durch vergleichende chemische und physikochemische Untersuchungen ebenfalls ausgeschlossen.

CUENI et al. (14) beobachteten 1971 bei den nach intraperitonealer Injektion des Produktes aus verbrannter Haut gestorbenen Mäusen eine Nekrose der proximalen Nierentubuli und Blutungen in die Lungenalveolen. Hier läßt sich eine möglicherweise generalisierte Zellmembranschädigung vermuten.

In den letzten Jahren gelang es, aus verbrannter menschlicher Haut und aus Serum verbrannter Patienten ein identisches Toxin zu isolieren (43, 60).

Um Verbrennungen und Verbrühungen unter kontrollierten Bedingungen am lebenden Tier vorzunehmen, entwickelte STÄDTLER (66) 1971 ein neues Verbrennungsmodell der Maus. Er konnte daran zeigen, daß sowohl durch die aktive Immunisierung als auch durch Behandlung mit heterologem antitoxischen Serum letal verbrannte Tiere weitgehend geschützt werden konnten (67).

Ein ähnlicher Therapieversuch wurde von SCHOENENBERGER et al. (60) unternommen. Kaninchen wurden mit 2 mal 10 mg/kg Körpergewicht menschlichem Verbrennungstoxin oder nativer Vorstufe intramuskulär immunisiert. Das aus Kaninchenserum gewonnene Antihumantoxin-IgG bzw. Antinativ-IgG wurde an Mäusen getestet. Es überlebten 80% der mit Antihumantoxin behandelten Tiere nach letaler Verbrennung gegenüber 0% der mit dem entsprechenden

antinativen IgG behandelten Kontrollen.

Aus dem Serum von Patienten mit schweren Verbrennungen isoliertes Verbrennungstoxin und seine nicht toxische Vorstufe wurden von KREMER (34) 1975 raster-elektronenmikroskopisch (REM) untersucht.

Im REM stellten sich sowohl die Toxin- als auch die Nativmoleküle in Kugelform dar. Der Molekulardurchmesser wurde für das Toxinmolekül mit 63,5 nm bestimmt und für das Nativmolekül mit 41 nm.

2. Bisherige Untersuchungen.

Durch die oben genannten Arbeiten konnten der Entstehungsmechanismus und die chemische Natur des Verbrennungstoxins weitgehend aufgeklärt werden. Die Auswirkungen auf den Organismus sind dagegen noch völlig ungeklärt. Aus den bisherigen Untersuchungen ergab sich, daß der Stoffwechsel der Leber nach Hautverbrennung gestört ist. Schon 1940 fand ZINCK (73) bei verbrannten Patienten Vakuolisierungen und grobe Abweichungen der Leberzellen von der Norm als Folge der Spätschäden nach Verbrennungen.

BEKHUM (7) teilte 1951 Veränderungen des Leberstoffwechsels nach Verbrennungen mit. Damals wurde an Leberschnitten der Ratte eine verminderte Harnstoffsynthese gezeigt.

Veränderungen der Enzymaktivitäten in der Leber wurden von verschiedenen Autoren beschrieben.

So fanden SPECTOR und PAULI(65) 1963 bereits Minuten nach dem Verbrennungstrauma einen Anstieg mehrerer Enzyme, darunter Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Laktat-Dehydrogenase. Auch DONATI et al. (15) 1964 teilten solche Befunde mit. Nach Verbrennung von 25% der Körperoberfläche wurden bei Ratten verschiedene Enzyme im Blutplasma über mehrere Tage hinweg erhöht gefunden.

ARTURSON (5) beobachtete 1963 bei der Ratte am 3. Tag

nach experimenteller Verbrennung einen Abfall der alkalischen Phosphatasewerte des Lebergewebes (Biochemische Bestimmung), in der Folgezeit kam es zu einem Anstieg über die Norm.

Unabhängig von der Stärke und Ausdehnung der Verbrennungen zeigte sich nach Verbrennungen ein Anstieg von SGPT und Serumcholinesterase. Alkalische Phosphatase und SGOT waren nur in der Hälfte der untersuchten Fälle vermehrt. Diese Befunde wiesen eher auf eine toxische Schädigung der Leber als auf eine vermehrte Freisetzung aus der verbrannten Haut hin (36).

HERRMANN et al. (26) und FETZER et al. (18) beschrieben 1965 histochemische Veränderungen der Enzymaktivitäten in Leber der Ratte nach Verbrennung. Es fanden sich eine Aktivitätsverminderung bei der ATP-ase, NAD-Cytochrom-c-Reduktase und Isozitrone Säure-Dehydrogenase, eine Aktivitätszunahme bei der alkalischen Phosphatase und einigen Esterasen.

Die Nierenstoffwechselveränderungen bei Hautverbrennungen wurde 1968 von TRUSS (68) beschrieben. Er wies darauf hin, daß die renalen Schäden in der Frühphase der Verbrennungskrankheit keine reinen Hypoxieschäden darstellen, sondern als Folge von toxischen Substanzen, die von der verbrannten Haut in den Kreislauf und in die Niere gelangen, anzusehen sind.

1967 berichteten KRÖNER et al. (35) über eine eingeschränkte Proteinsynthese und einen erniedrigten Energiequotienten ATP/ADP in Lebern verbrannter Ratten.

KREMER et al. (33) haben 1975 die Leber von subletal verbrannten Mäusen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Verbrennung erfolgte nach einer standardisierten Methode von STÄDTLER (66) drittgradig an 5,4% der Körperoberfläche. Die Untersuchungen zeigten vom 5. Tag

nach Verbrennung eine intramitochondriale Vakuolisierung der Leberzellen. Außerdem fand sich in makro- und mikroradiographischen Untersuchungen eine starke Anreicherung des Toxins in Hepatozyten.

1976 untersuchte SCHÜLMERICH (55) Leberstoffwechselveränderungen nach standardisierter Hautverbrennung (modifiziert nach STÄDTLER) an der Ratte. Es wurde eine deutliche Senkung des Energiequotienten ATP/ADP und einen Rückgang der Syntheseleistungen der Lebern nach Verbrennung beschrieben.

In zahlreichen klinischen und experimentellen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß Hautverbrennungen eine starke Wirkung auf den Organismus, besonders auf die Leber haben. Als Ursache dieser Störungen wurde eine Mitbeteiligung eines spezifischen Verbrennungstoxins immer wieder diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, zunächst eine eventuelle Übereinstimmung von Effekten des wie oben beschrieben isolierten Verbrennungstoxins mit den aus der Literatur bekannten Verbrennungseffekten darzustellen, und anschließend einen genaueren Einblick in Ansatzpunkt und Wirkungsmechanismus dieses Toxins zu gewinnen.

Die Untersuchungen wurden an der isoliert perfundierten Rattenleber nach intraperitonealer Gabe dieses spezifischen cutanen Verbrennungstoxins durchgeführt.

B. MATERIAL.

Wir führten die Versuche an weiblichen Ratten aus dem Stamm CH bb THOM mit einem Körpergewicht von 200-240 g und Alter von 60-65 Tagen durch, die mit Standardfutter der Fa. Soest/Westf. und Trinkwasser ad libitum ernährt wurden.

Die Narkose erfolgte mit 5-Äthyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure, Na-Salz (Nembutal-Na^R) der Firma Abbott/Ingelheim und teilweise mit Äther der Firma Hoechst (Frankfurt/Main).

Zur Herstellung des Perfusionsmediums wurden folgende Materialien benutzt:

- Rinderalbumin (trocken, reinst) der Behringwerke Marburg/Lahn,
- Rinderblut vom Schlachthof/Wiesbaden,
- Laktat von der Firma Fluka, Buchs/Schweiz,
- Pyruvat von der Firma Boehringer/Mannheim,
- Glukose von der Firma Merck/Darmstadt,
- Reverin^R (Pyrrolidino-methyl-tetracyclin) der Firma Hoechst, Frankfurt/Main,
- alle weiteren Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt.

Für die Bestimmung von Hämoglobin, Harnstoff und Enzymaktivitäten wurden die gebrauchsfertigen Reaktionslösungen in Form von Testkombinationen von der Fa. Boehringer/Mannheim bezogen, ebenso die Enzyme und Coenzyme für die enzymatisch-optischen Tests.

C. METHODEN.

1. Toxin

Wie eingangs beschrieben, gelang es in den letzten Jahren, das Verbrennungstoxin zu isolieren und zu charakterisieren. Das Toxin wurde in vitro aus der Haut steril gehaltener Mäuse unter Anwendung kontrollierter thermischer Energie von 250°C für 15 sec bei 500 g/cm^2 isoliert. Es handelt sich dabei um einen toxischen Lipid-Protein-Komplex, der durch hitzeinduzierte Polymerisation aus einer monomeren, in der ungeschädigten Haut vorkommenden, nicht toxischen (nativen) Vorstufe entsteht (14,56,57,58,59).

Das Molekulargewicht des nativen Komplexes liegt um 1×10^6 Dalton, das des toxischen um 3×10^6 . Die Lipid- und Proteinverteilung sowie die chemische Zusammensetzung beider Substanzen sind praktisch identisch. Beide Substanzen enthalten 40 % Lipid, 60 % Proteine und 1 % Aminosucker. Das Apoprotein besteht aus 6 Oligopeptiden mit verschiedenen Molekulargewichten. Der Lipidanteil setzt sich aus 6 verschiedenen Neutrallipiden zusammen. Für die Toxizität ist der Apoproteinanteil hauptverantwortlich, der Lipidanteil ist als Strukturzement in unspezifischer Weise für die volle Wirkung nötig (14).

Es handelt sich also beim Verbrennungstoxin um eine Trimerform der ursprünglichen Zellwand-Membrankomponente der Basalzellschicht der Epidermis (57,60).

Für die hier durchgeführten Untersuchungen benutzten wir ein Verbrennungstoxin, das von K. SCHMIDT (54) analog zu den Methoden von SCHOENENBERGER (56) isoliert wurde.

Das Toxin liegt als Lyophilisat vor. Dieses Lyophilisat ist wegen seiner Apolarität in physiologischen Lösungsmitteln unlöslich. Deshalb wurde das Toxin in physiologischer Kochsalzlösung bei 20000 Umdreh./min unter Eiskühlung 3 min mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und als Suspension zur Injektion benutzt.

2. Vorbehandlung.

Zur Durchführung der Versuche wurden Ratten mit einem Körpergewicht von 200-240 g verwendet. Das Lebergewicht lag zwischen 6,7 und 8,4 g.

Es wurden zwei Tiergruppen gebildet:

I. 12 toxinbehandelte Tiere.

Dieser Rattengruppe wurde intraperitoneal Verbrennungstoxin in einer Dosis von 15 mg (in 2,5 ml physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert) injiziert.

II. 7 Kontrolltiere.

Die Kontrollgruppe erhielt nur 2,5 ml physiologische NaCl-Lösung intraperitoneal.

Die Tiere wurden nach der Vorbehandlung unter normalen Bedingungen in Einzelkäfigen gehalten. Aufgrund der Ergebnisse von KREMER et al. (33) wählten wir eine Vorbehandlungszeit von 123-126 Stunden. 24 Stunden vor der Perfusion wurde allen Tieren das Futter entzogen.

Während der Vorbehandlungszeit verstarb keines von allen behandelten Tieren.

3. Präparation der Leber.

Die Ratten wurden präoperativ gewogen. Es ergab sich bei beiden Gruppen eine relativ gleiche Gewichtsabnahme (Tabelle 1).

Die Präparation der Leber wurde in Pentobarbitalnarkose (75 mg/Kg Körpergewicht i.p.) teilweise mit leichter Äthernarkose vorgenommen.

R

Nach Injektion von 500 I.E. Heparin (Thrombophob) der Fa. Normark in die Beinvene wurde die Leibeshöhle durch

mediane Laparatomie eröffnet. Eine Kunststoffkanüle wurde in die Vena portae eingelegt. Die Vena cava inferior wurde proximal vom Abgang der Nierenvene unterbunden. Eine Abschlußkanüle wurde in die Vena cava inferior oberhalb des Zwerchfells eingeführt und eingebunden (Abb. 1). Eine Kanülierung des Gallengangs wurde nicht durchgeführt (41). Anschließend wurde die Leber atraumatisch freipräpariert und an den künstlichen Kreislauf angeschlossen.

Die Operation dauerte 15 - 20 min, wobei die Leber 4 bis 6 min ohne Sauerstoffversorgung war.

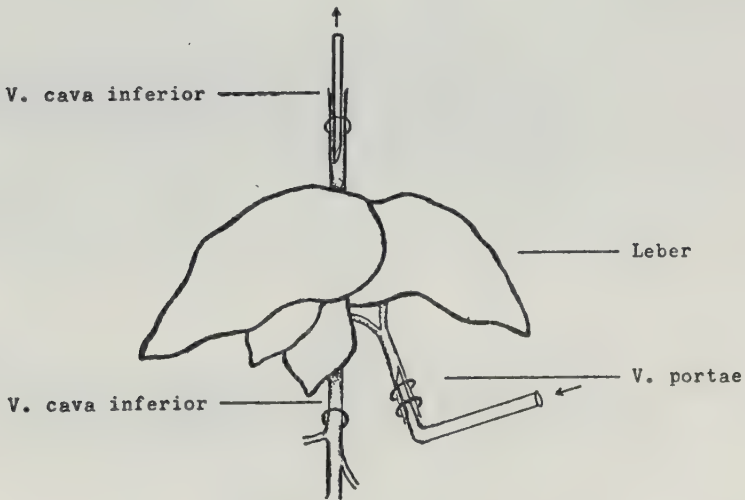
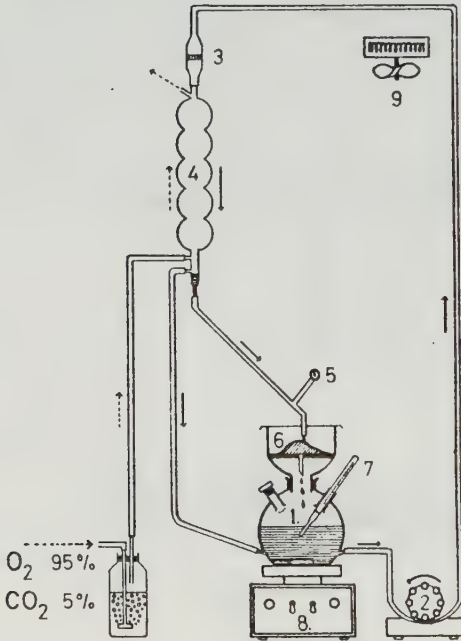


Abb. 1 Isolierte, kanülierte Rattenleber.

4. Perfusion.

Die Leberperfusion erfolgte nach der von MILLER et al. (41) und BRAUER et al. (10) eingeführten, von SCHIMASSEK (50,51) erweiterten Technik unter Zuhilfenahme der von GLOGNER et al. (20) angegebenen Qualitätskriterien. (Abb. 2)



VERSUCHSANORDNUNG

- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Blutreservoir | 2. Rollenpumpe | 3. Filter |
| 4. Oxygenator | 5. Manometer | 6. Leber |
| 7. Thermometer | 8. Rührer | 9. Heizventilator |

Abb. 2. Übersicht über das Perfusionssystem.

Das Perfusionsmedium bestand aus frischen, zweimal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Rindererythrozyten, die in Krebs-Henseleit-Pufferlösung (29) bis zu einem Hämoglobingehalt von 7,75 - 8,75 g% suspendiert waren.

Von dieser Suspension wurden 150 ml unter Hinzufügung von 2,5 g% Rinderalbumin als Kolloidosmotischem Anteil, 0,9 mg% Reverin^R, 3,70 mMol/l Glukose, 1,78 mMol/l Laktat und 0,09 mMol/l Pyruvat zum Versuch verwendet.

Pufferlösung nach Krebs-Henseleit:

100 ml	Na Cl	9,0 % ig
4 ml	K Cl	11,5 % ig
3 ml	Ca Cl ₂ · 2 H ₂ O	16,1 % ig
1 ml	KH ₂ PO ₄	21,1 % ig
1 ml	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	38,2 % ig
210 ml	NaHCO ₃	1,3 % ig (vor Gebrauch begast)
981 ml	Aqua bidest.	

1300 ml Pufferlösung

Das Perfusat wurde eine halbe Stunde vor und während der Perfusion mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) begast.

Die Temperatur des Perfusats und des Perfusionskabinetts wurde mit Hilfe eines Thermostaten auf 36,5°C (± 0,5°C) reguliert.

Die vor und nach der Perfusion bestimmten pH-Werte des Perfusats lagen innerhalb physiologischer Grenzen (Tab. 1) und unterschieden sich bei behandelten Toxintieren und Kontrollen nicht.

Der aus der Tropfenzahl ermittelte Blutdurchfluß der Leber schwankte zwischen 10 und 14 ml pro Minute bei einem Druck von 14 cm H₂O.

Bei guten Durchströmungsbedingungen stellte sich bald eine optimale Durchblutung der isolierten Leber mit gleichmäßig hellroter Färbung des Organs ein. Im Überstand des zentrifugierten Perfusats nach der Perfusion wurde das hämolysierte Hb. bestimmt.

Die Perfusionsdauer betrug 95 Minuten.

Zur Substratbestimmung wurden 8 Proben von je 1 ml aus dem Perfusat entnommen (Direkt vor dem Einsetzen der Leber in das Perfusionssystem, nach 5, 30, 45, 60, 65, 80 und 95 Minuten Perfusion). Zusätzlich wurden zur Untersuchung der Enzymaktivitäten 3 Citratblutproben von je 1,5 ml (0., 60. und 95. Minute) entnommen.

Für weitere Untersuchungen wurde Lebergewebe mittels des Frierstopp-Verfahrens in der 60. und 95. Minute abgenommen. Hierzu wurde ein kleiner Leberlappen nach Anlegen einer Seidenligatur abgebunden. Das Organstück wurde mit der Schere abgetrennt und so rasch wie möglich zwischen Metallblöcken einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange gepreßt. Das von den Blöcken erfaßte Gewebe wurde sofort in flüssigen Stickstoff geworfen und weiter verarbeitet.

Die Leber wurde sofort nach Ende der Perfusion über die Pfortader bei einem Druck von 22 cm H₂O mit vorgekühlter (+4°C) Spüllösung (Krebs-Henseleit-Pufferlösung + 1 ml Heparin + 2ml CaCl₂ 16 %ig) für max. 60 Sekunden gespült und anschließend mit gepufferter Glutaraldehydlösung nach FAHIMI (16) 15 Minuten fixiert.

Aus der so fixierten Leber wurden Schnitte für die elektronenoptischen Untersuchungen entnommen.

Bei allen Perfusionen wurde dem Perfusat in der 64. Minute Laktat in einer Endkonzentration von 10 mMol/l zugesetzt.

5. Probenaufbereitung.

Die zur Substratbestimmung entnommenen Proben wurden in 1ml 8 %ige kalte ($+4^{\circ}\text{C}$) Perchlorsäure gegeben, gut gemischt und anschließend 10 min mit 2500 Umdrehungen/min in der Kälte bei $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert, mit 0,4 ml 1 N KOH versetzt und mit KHCO_3 -Pulver neutralisiert. Die Neutralisation erfolgte mit Spezial-Indikatorpapier der Firma Merck (pH 6,4 - 8,0).

Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und bis zur Bestimmung der Stoffwechselprodukte bei -10°C aufbewahrt.

In den so behandelten Proben wurden Glukose, Laktat, Pyruvat, Acetacetat, β -Hydroxybutyrat und Harnstoff bestimmt.

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde 1,5 ml Blut aus dem Perfusat unter Zusatz von 0,04 ml 3,8 %iger Na-Citratlösung entnommen und anschließend 10 min bei 6000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde sofort abpipettiert und bis zur Bestimmung gefroren aufbewahrt. Es wurde dann die Aktivität von GOT, GPT, MDH und GlDH untersucht.

Alle Bestimmungen erfolgten nach Standardmethoden (8).

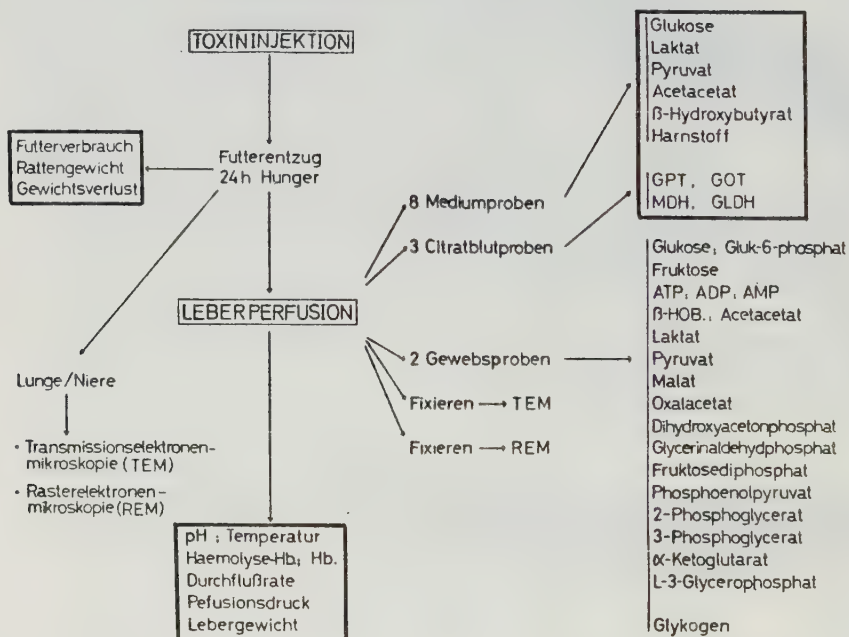


Abb. 3. VERSUCHSSCHEMA. Die in der Abbildung umrandeten Parameter wurden in dieser Arbeit bestimmt.

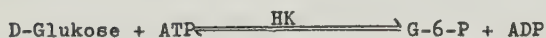
6. Meßmethoden.

Die im Folgenden beschriebenen Bestimmungen erfolgten nach dem Prinzip der enzymatisch-optischen Methode von WARBURG (69).

Für die Messungen stand uns ein Eppendorf-Photometer in Kombination mit einem automatischen Kompensations-schreiber von Eppendorf zur Verfügung.

Glukose : Glukose wurde enzymatisch nach dem von SCHMIDT beschriebenen Verfahren bestimmt. Glukose wird durch das Enzym Hexokinase unter Mitwirkung von ATP zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert. G-6-P wird durch das Enzym G-6-P-Dehydrogenase in Gegenwart von NADP in Glukonat-6-phosphat überführt.

Die aus NADP entstehende NADPH-Menge ist äquivalent der G-6-P bzw. Glukose-Menge. Die resultierende Extinktionszunahme wird im Photometer bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm gemessen.



Laktat : Die Laktatbestimmung erfolgte nach HOHORST mit Laktat-Dehydrogenase und NAD.

L-Laktat wird in der von Laktat-Dehydrogenase katalysierten enzymatischen Reaktion durch NAD zu Pyruvat oxydiert. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite des Laktats. Unter NAD-Überschuß, alkalischem Milieu und Abfangen des gebildeten Pyruvats mit Hydrazin kann das Gleichgewicht völlig auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden. Die NADH-Bildung wird bei Hg 366 nm gemessen.



Pyruvat : Das Pyruvat wurde nach Th. BÜCHER et al. mit Laktat-Dehydrogenase photometrisch bestimmt.



Man mißt die hervorgerufene NADH-Abnahme bei Hg 366 nm.

Acetacetat und β -Hydroxybutyrat : Die beiden Substrate wurden nach D.H. WILLIAMSON enzymatisch bestimmt.

Aus dem Acetacetat entsteht unter Wirkung einer β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase β -Hydroxybutyrat.

Bei pH = 7,0 und überschüssigem NADH wird Acetacetat zu mindestens 98 % zu β -Hydroxybutyrat reduziert.

Bei pH = 8,5 wird β -Hydroxybutyrat zu etwa 40 % zu Acetacetat oxydiert. Trennt man Acetacetat als Hydrazon ab, so verläuft die Reaktion vollständig von rechts nach links. Man mißt bei Hg 366 nm die NADH-Abnahme bei der Acetacetatbestimmung und die NADH-Zunahme bei der Bestimmung des β -Hydroxybutyrats.



Hämoglobin und Hämolyse-Hb : Das in dem Perfusat und im Überstand des zentrifugierten Perfusats enthaltene Hämoglobin wird durch Kalium-Hexacyanoferrat-(III) (Kaliumferricyanid) zu Hämoglobin (Met-Hämoglobin) oxydiert, das dann mit Kaliumcyanid zu Hämoglobincyanid reagiert. Hämoglobincyanid ist sehr stabil und kann aufgrund seines Absorptionsmaximums bei Hg 546 nm photometrisch gemessen werden.

Die Auswertung erfolgte wie üblich aus der Extinktionsänderung.

Für die Berechnung von Hb. - und Substratkonzentrationen im Perfusat gilt allgemein die Formel:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V \cdot F}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

c	Konzentration ($\mu\text{Mol/ml}$)
ΔE	Extinktionsdifferenz
ϵ	Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 / \mu\text{Mol}$)
d	Schichtdicke (cm)
V	Küvettenvolumen (ml)
v	Probevolumen im Test (ml)
F	Verdünnungsfaktor
ϵ_{366}	$= 3,3 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol.}$
ϵ_{546}	$= 11,0 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol.}$

Für die Berechnung von Hb-Konzentrationen gilt die Formel:

$$c \text{ (g/100 ml)} = \frac{\text{MG} \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot 10^4 \cdot v} \cdot F \cdot \Delta E$$

MG für Hb. = 16114

Harnstoff : Die Harnstoff-Bestimmung erfolgte nach FAWCETT und SCOTT farbphotometrisch mit Boehringer-Harnstofftest.

Harnstoff wird durch das Enzym Urease zu CO_2 und NH_3 hydrolysiert. In Gegenwart von Nitroprussidionen bildet Ammoniak mit Phenol und Hypochlorit einen blauen Indophenolfarbstoff, dessen Farbintensität bei Hg 546 nm der Harnstoffkonzentration proportional ist.



Die Berechnung der Harnstoffwerte erfolgte mit Hilfe eines Standards nach der Formel:

$$c = \frac{\Delta E_p \cdot c_{\text{St}} \cdot F}{\Delta E_{\text{St}}}$$

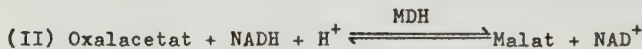
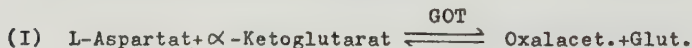
c	Harnstoff-Konzentration im Medium ($\mu\text{Mol/ml}$)
ΔE_p	Extinktionsdifferenz der Probe
ΔE_{St}	Extinktionsdifferenz des Standards
c_{St}	Harnstoff-Konzentration des Standards ($\mu\text{Mol/ml}$)
F	Verdünnungsfaktor

Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde hier indirekt über die Messung der Absorptionsänderung von NADH bestimmt. NADH ist Meßgröße und aufgrund seiner Absorption bei Hg 366 nm photometrisch leicht zu bestimmen.

GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) :

Die GOT-Bestimmung erfolgte enzymatisch nach der Methode von KARMEN et al.

Das Enzym GOT katalysiert die Gleichgewichtsreaktion (I). Man bestimmt die Aktivität der GOT aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen Oxalacetat-Zunahme. Diese wird in der gekoppelten, durch Malat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion (II) bestimmt. Die NADH-Abnahme wird photometrisch bei Hg 366 nm gemessen.



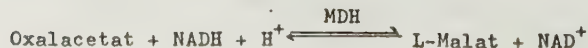
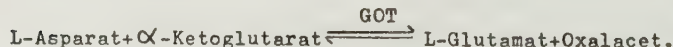
GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) :

Die GPT wurde nach der Methode von WRÓBLEWSKI und LADUE bestimmt. Es gilt das gleiche Prinzip wie bei der oben beschriebenen GOT- Bestimmung.



MDH (Malat-Dehydrogenase) :

MDH wurde nach der Methode von BERGMAYER bestimmt. Die Reaktion verläuft wie bei der GOT-Bestimmung.

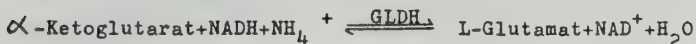


Die pro Zeiteinheit umgesetzte Oxalacetat-Menge, gemessen an der Abnahme der NADH-Extinktion, ist Maß für die MDH-Aktivität.

GLDH (Glutamat-Dehydrogenase) :

GLDH wurde nach der von E. SCHMIDT beschriebenen Methode bestimmt.

Das Enzym GLDH katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion:



Man bestimmt die Aktivität der GLDH aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH- Abnahme.

Für die Berechnung von Volumenaktivitäten gilt allgemein die Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \Delta c / \Delta t = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} / \Delta t \quad (\mu\text{Mol/ml min})$$

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{1000 \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t \quad (\text{U/l})$$

c Konzentration ($\mu\text{Mol/ml}$)

ΔE Extinktionsdifferenz

ϵ Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 / \mu\text{Mol}$)

t Zeit (min)

d Schichtdicke (cm)

V Küvettenvolumen (ml)

v Probevolumen im Test (ml)

U (Unit) = Eine internationale Einheit ist die Enzymaktivität, die bei 25°C $1 \mu\text{Mol}$ Substrat in 1 min umsetzt.

Die Volumenaktivität wird jetzt entsprechend den internationalen Empfehlungen auf 1 Liter Körperflüssigkeit bezogen.

7. Ergebnisverwertung.

Die ersten 30 Minuten der Perfusion dienten der Äquilibration des Perfusionssystems und wurden dementsprechend als Vorphase vernachlässigt.

Die folgenden 30 Minuten (zwischen 30. und 60. Perfusionsminute) wurden als „endogene“ Phase mit normalerweise hochaktiven Stoffwechsel zur Erreichung physiologischer Metabolitspiegel im Perfusat betrachtet. Die Zeit von der 65. bis zur 95. Minute wurde als Phase nach Substratgabe (s.S. 14) bezeichnet und für die Bestimmung der Bildungsraten nach Substratgabe benutzt (Abb. 4).

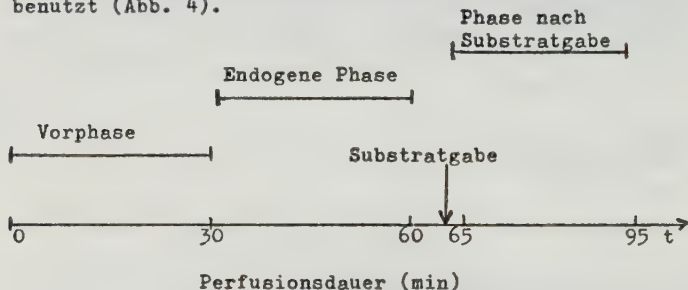


Abb. 4. Zeitliche Einteilung der Perfusion

Die Bildung von Stoffwechselprodukten wurde aus der Differenz der Konzentrationen nach Perfusionsbeginn und 30 Minuten bzw. nach 30 und 60 Minuten, und nach 65 und 95 Minuten berechnet.

Daraus wurde die Minutenbildungsrate nach der folgenden Formel bestimmt:

$$BR = \frac{c \cdot GV}{LG \cdot t}$$

- BR Minutenbildungsrate ($\mu\text{Mol/g}\cdot\text{min}$)
c Konzentration in 1 ml Medium ($\mu\text{Mol/ml}$)
GV Gesamtvolumen des Perfusats bei Probenentnahme (ml)
LG Lebergewicht (g)
t Zeit (30 Minuten)

Als Maß für die intramitochondrialen Redoxverhältnisse wurde der Quotient β -Hydroxybutyrat/Acetacetat aus den Perfusionskonzentrationen errechnet, ebenso der Quotient aus Laktat- und Pyruvatwerten als Maß für die extramitochondrialen Verhältnisse (11,32,51,62).

Als Maß für die Fettsäureoxydation wurde die Ketonkörperbildung aus den Bildungsraten von β -Hydroxybutyrat und Acetacetat berechnet (30).

Um eine quantitative Aussage über den Anteil des Laktatumsatzes in Glukose zu erhalten, wurde der Quotient aus Gesamtaufnahme von Laktat und Pyruvat einerseits und der gebildeten Glukose andererseits bestimmt.

Als Maß für die eventuelle Mitochondrienmembran- bzw. Zellmembranbeschädigung wurden die Enzymaustritte (GLDH, GOT, MDH bzw. GPT) ins Perfusat als Differenz der Konzentrationen bei Perfusionsbeginn und nach 95 Minuten berechnet (52,53).

8. Statistische Verfahren.

Die hier benutzten Formeln und Rechenverfahren sind Standardmethoden (13).

Die Werte sind in allen Tabellen als Mittelwert $\bar{x}$ $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) angegeben.

Die Werte aus den beiden Gruppen wurden nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

arithmetisch gemittelt.

Die Standardabweichung s (mittlere quadratische Abweichung) ist die Quadratwurzel aus der Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) aller Meßwerte einer Verteilung von ihrem arithmetischen Mittel, dividiert die um 1 verminderte Anzahl der Messungen.

$$SAQ = (x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2$$

$$= \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$\bar{x}$ arithmetisches Mittel aller Meßwerte

x_i i-ter Meßwert in der Häufigkeitsverteilung

s Standardabweichung

n Anzahl aller Meßwerte.

Hierbei haben wir folgende Signifikanzkriterien angenommen:

$p < 0,01$ = hochsignifikant

$p < 0,05$ = signifikant

$p < 0,1$ = schwachsignifikant

$p > 0,1$ = nicht signifikant (n. s.')

Infolge technischer Defekte während der Perfusion konnten nur 9 Lebern mit Toxin behandelter Tiere und 6 Kontrolltiere in die Endrechnung eingehen.

D. ERGEBNISSE

1. Allgemeine Ergebnisse.

Die Lebern der Kontrollgruppe waren schwerer als die der Toxingruppe (7,89 gegenüber 7,19 g), der Quotient aus Rattengewicht und Lebergewicht war jedoch bei beiden Gruppen mit etwa 28 annähernd gleich (Tab. 1).

Die Lebern der beiden Rattengruppen zeigten makroskopisch keine Unterschiede.

Die nach der Perfusion bestimmten Hämolyse-Hb-Werte der Kontrollen lagen etwa um den Faktor 3 höher als die der Toxingruppe (Tab. 1).

Alle weiteren Parameter wurden im vorigen Kapitel bereits behandelt und zeigten bei den beiden Gruppen keine wesentlichen Unterschiede (siehe Tab. 1).

ALLGEMEINE DATEN

	TOXIN	KONTROLLE
Rattengewicht	203,8 $\pm$ 6,712 g	221,0 $\pm$ 20,891 g
Lebergewicht	7,19 $\pm$ 0,253 g	7,89 $\pm$ 0,694 g
<u>Rattengewicht</u> <u>Lebergewicht</u>	28,34 $\pm$ 0,392	27,98 $\pm$ 1,273
Gewichtsverlust	8,66 $\pm$ 6,595 g	10,08 $\pm$ 4,147 g
Vorbehdlg.zeit	123 h	126 h
Hb. des Perf.	7,756 $\pm$ 1,026 g%	8,752 $\pm$ 1,380 g%
Hämolyse-Hb.	0,115 $\pm$ 0,080 g%	0,303 $\pm$ 0,117 g%
pH 0 min	7,316 $\pm$ 0,033	7,348 $\pm$ 0,064
pH 5 min	7,304 $\pm$ 0,058	7,333 $\pm$ 0,050
pH 95 min	7,425 $\pm$ 0,035	7,416 $\pm$ 0,051

Tabelle 1. Allgemeine Daten der Perfusion.

Vergleich Toxin - Kontrolle.

2. Laktat + Pyruvataufnahme.

Wie Abbildung 5 zeigt, enthält das Perfusat zu Perfusionsbeginn durch vorherigen Zusatz von Substraten zum Medium einen hohen Gehalt an Laktat und Pyruvat. Die hohen Ausgangswerte von Laktat und Pyruvat wurden durch gleichmäßige Aufnahme beider Metaboliten in die Leber während der ersten 60 Minuten abgebaut. Die Spiegelstellung von Laktat und Pyruvat ist unabhängig von der Höhe der Ausgangswerte im Perfusionsmedium. Auch bei extrem niedrigem Substratgehalt ohne vorherigen Zusatz zum Perfusat werden in den ersten 30 Minuten der Perfusion von der isolierten Leber gleich hohe Spiegel eingestellt wie bei höher vorgestelltem Substratgehalt (51).

Die Aufnahme von Laktat und Pyruvat aus dem Perfusat zeigte in der Vorphase und in der endogenen Phase zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Nach Laktatgabe war die Aufnahme bei den Lebern der Toxintiere deutlich geringer als bei denen der Kontrollen.

Die Minutenaufnahmerate der Leber für Laktat und Pyruvat zeigte nur in der Phase nach Laktatgabe eine signifikante Differenz (Tab. 2).

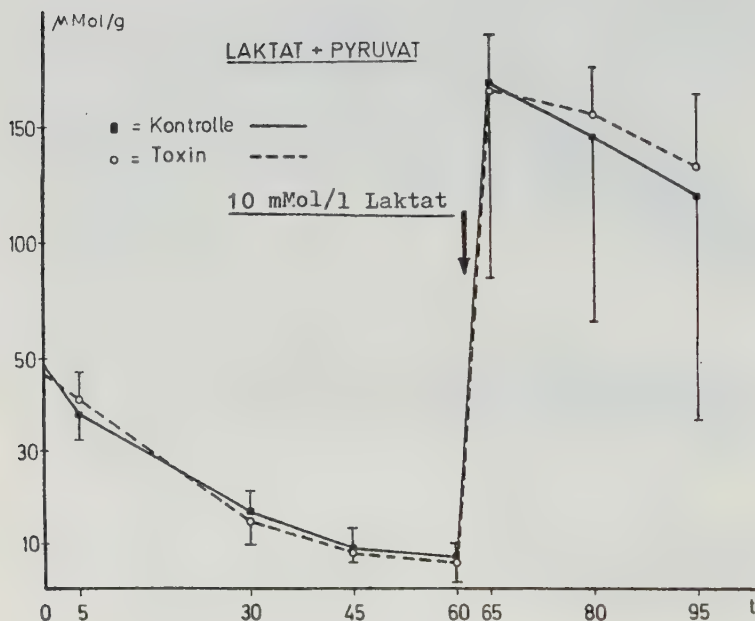


Abb. 5. Änderung der Laktat + Pyruvat-Aufnahme aus dem Perfusat während der Perfusion vor und nach Laktatgabe.

Phase	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
0 -30 Min.	9	-1,062±1,250		6	-1,072±0,383		p = n.s.
30- 60 Min.	9	-0,298±0,146		6	-0,318±0,095		p = n.s.
65- 95 Min.	8	-1,037±0,770		4	-1,822±0,491		p < 0,1

Tab. 2. Aufnahme von Laktat und Pyruvat in der Vorphase, endogenen Phase und Phase nach Laktatgabe.
(Angaben in $\mu\text{Mol/g.min}$).

3. Glukoseausschüttung.

Die Werte der Glukosebildung für die Kontrollen lagen im Bereich der bisher in der Literatur angegebenen (25,38,51).

In der Abbildung 6 sind die Veränderungen der Glukoseausschüttung ins Perfusat in allen Phasen dargestellt. Es fand sich in der Vorphase und endogenen Phase eine verminderte Glukoseausschüttung bei den Lebern der Toxintiere, jedoch ließ sich hier rechnerisch keine Signifikanz sichern.

Nach Laktatgabe wurde der Unterschied noch deutlicher, dies bedeutet, daß die Glukoneogenese bei Toxinlebern im Gegensatz zu den Kontrollen durch Laktatgabe nicht stimuliert werden konnte.

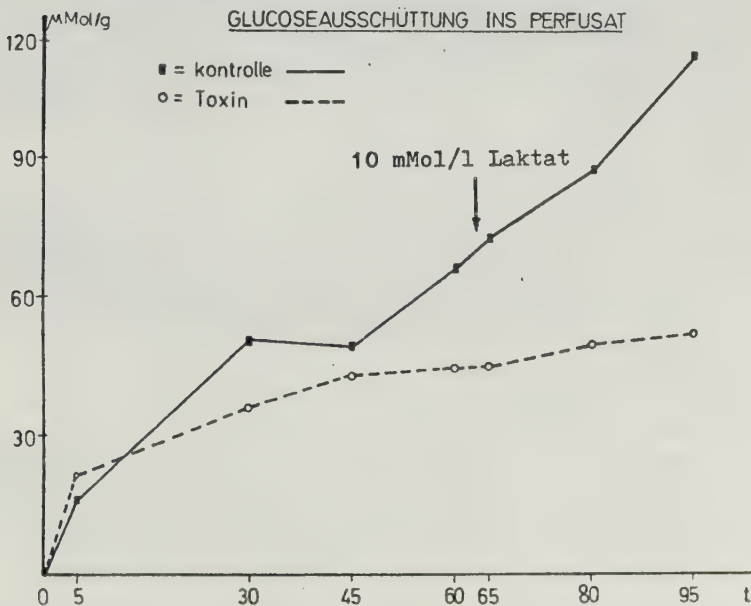


Abb. 6. Kinetik der Glukosespiegel im Perfusat.

Phase	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
0 -30 Min.	8	1,408 $\pm$ 0,669		6	1,696 $\pm$ 1,267		p = n.s.
30-60 Min.	8	0,355 $\pm$ 0,315		6	0,515 $\pm$ 0,386		p = n.s.
65-95 Min.	8	0,233 $\pm$ 0,464		6	1,350 $\pm$ 1,853		p < 0,01

Tab. 3. Die Glukoseabgabe in den drei Perfusionsphasen (Angaben in $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{min}$).

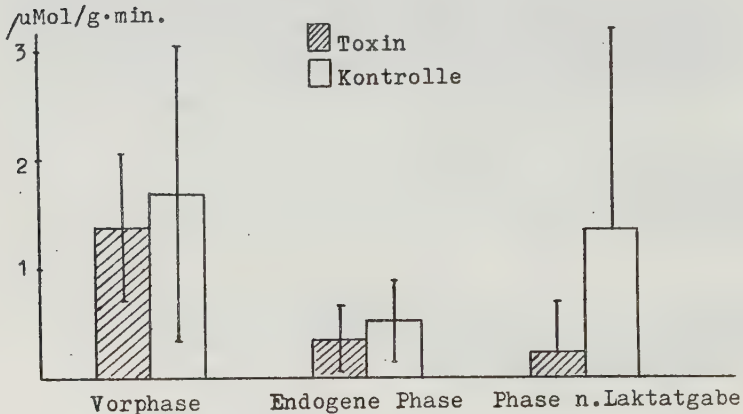


Abb. 7. Die Glukoseminutenabgaberraten in den drei Perfusionsphasen. Vergleich Toxin-Kontrolle.

Die Glukoseabgaberrate bei den Toxintieren in der endogenen Phase war um ein Drittel vermindert (Tab.3). Wegen der hohen Standardabweichungen konnte jedoch durch den Student-t-Test keine Signifikanz errechnet werden. Dagegen zeigte sich in der Phase nach Laktatgabe eine hochsignifikant verminderte Glukoseausschüttung bei der Toxingruppe.

4. Laktat + Pyruvat

Glukose

Wie oben bereits beschrieben, fand sich nach Laktatgabe eine deutlich verminderte Glukoseausschüttung bei den Lebern der Toxintiere. Auch der Quotient aus Laktat + Pyruvat und Glukoseabgabe zeigte nur in der Phase nach Laktatgabe einen hochsignifikanten Unterschied zwischen toxinbehandelten Lebern und denen der Kontrollen. In den anderen Phasen bestand keine wesentliche Differenz zwischen beiden Gruppen (Tab. 4).

	TOXIN		KONTROLLE	
1. Quotient (0 -30 Min.)	$\bar{x}$	0,754	$\bar{x}$ 0,632	Signifikanz $p = n.s.$
	s	$\pm 0,318$	s $\pm 0,286$	
	n	8	n 6	
2. Quotient (30-60 Min.)	$\bar{x}$	0,839	$\bar{x}$ 0,618	$p = n.s.$
	s	$\pm 0,429$	s $\pm 0,332$	
	n	8	n 6	
3. Quotient (65-95 Min.)	$\bar{x}$	4,349	$\bar{x}$ 1,349	$p < 0,001$
	s	$\pm 1,543$	s $\pm 0,378$	
	n	8	n 4	

Tab. 4. Quotient aus Aufnahme von Laktat + Pyruvat und Abgabe von Glukose. Vergleich Toxin-Kontrolle (n.s. = nicht signifikant).

5. Harnstoffbildung.

Die erhaltenen Werte der Kontrollen stimmten mit den Literaturangaben überein (39,40,42).

Die Harnstoffsynthese war in der endogenen Phase und nach Laktatgabe bei der Toxingruppe gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermindert. Hier fanden sich signifikante Differenzen. Die entsprechende Verlaufskurve ist in Abb. 8 dargestellt.

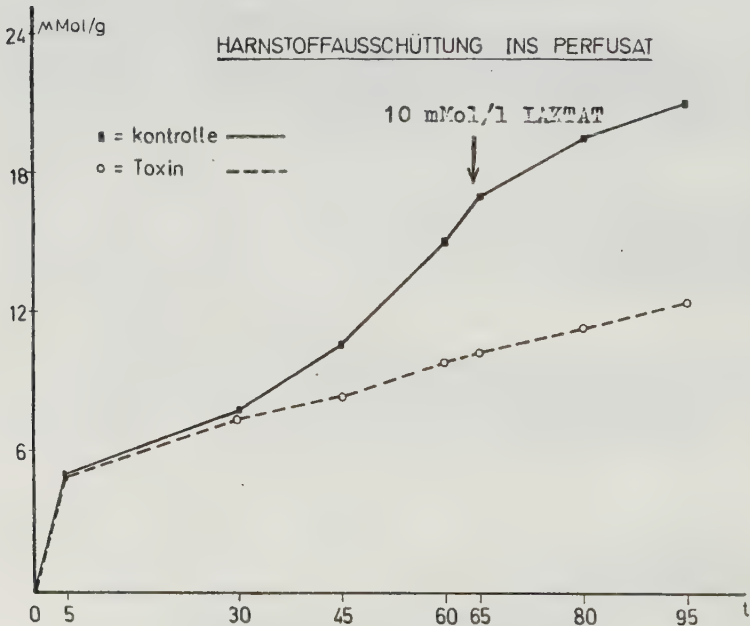


Abb. 8. Verlauf der Harnstoffkonzentration im Perfusionsmedium während der Perfusion.

Die Minutenbildungsrate des Harnstoffs während der endogenen Phase ergab eine hochsignifikante Differenz.

In der Phase nach Laktatgabe fand sich ebenfalls eine deutliche Differenz, hier ließ sich jedoch wegen hoher Standardabweichung statistisch keine Signifikanz sichern (Tab.5).

Phase	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
0 -30 Min.	8	0,247	$\pm 0,108$	6	0,256	$\pm 0,079$	p = n.s.
30-60 Min.	7	0,074	$\pm 0,057$	6	0,217	$\pm 0,185$	p < 0,01
65-95 Min.	8	0,073	$\pm 0,131$	6	0,136	$\pm 0,128$	p = n.s.

Tab. 5. Harnstoffbildungsrate während der Perfusion.
(Angaben in $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{min}$).

6. Ketonkörperbildung.

Die Ergebnisse der Ketonkörperausschüttung bei den Kontrollen entsprachen etwa den bisher in der Literatur angegebenen Werten (31,38,72).

Die Ausschüttung von Ketonkörpern ins Perfusat zeigte keinen Unterschied in der Vorphase. Nur in der endogenen Phase und nach Laktatgabe fand sich eine reduzierte Ketonkörperbildung im Perfusat bei den Lebern der Toxintiere gegenüber den Kontrollen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Abb. 9 gibt eine entsprechende Verlaufskurve.

Die Werte der Minutenbildungsrate sind aus Tab. 6 ersichtlich.

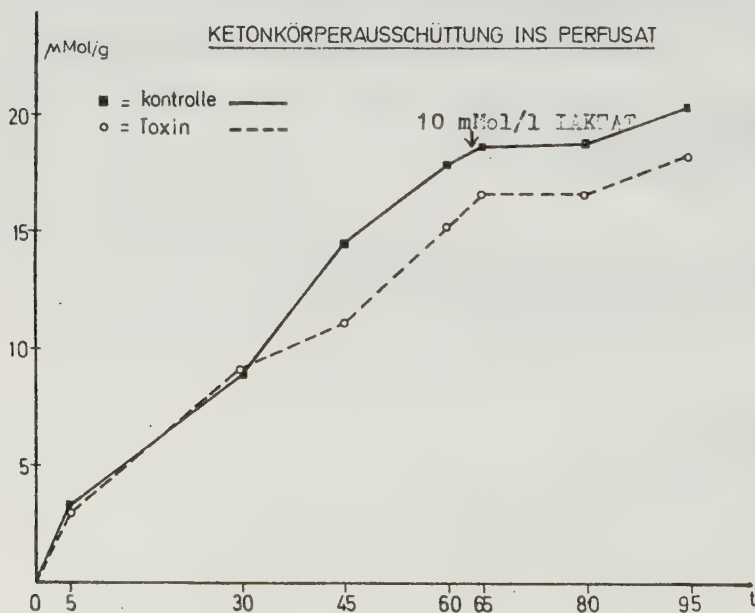


Abb. 9. Kinetik der Ketonkörperspiegel im Perfusat.

Phase	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
0 -30 Min.	9	0,299	$\pm 0,043$	6	0,296	$\pm 0,076$	p = n.s.
30-60 Min.	9	0,206	$\pm 0,130$	6	0,301	$\pm 0,225$	p = n.s.
65-95 Min.	6	0,048	$\pm 0,042$	6	0,012	$\pm 0,169$	p = n.s.

Tabelle 6. Minutenbildungsraten von Ketonkörpern in den drei Perfusionsphasen. Vergleich Toxin-Kontrolle.
(Angaben in $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{min}$).

7. Verhalten der Redoxquotienten.

Die Redoxquotienten aus Laktat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetacetat erbrachten keine großen Unterschiede. Nur bei dem Laktat/Pyruvat-Quotienten war ein schwach signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erfassen.

Die Werte der Kontrollen lagen im Bereich der in der Literatur angegebenen (20,31,38,51,62).

Laktat/Pyruvat :

Die Ergebnisse der Laktat/Pyruvat-Quotienten sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Nur in der 95. Minute fand sich ein schwach signifikante Abnahme des Redoxquotienten Laktat/Pyruvat bei der Toxingruppe gegenüber den Kontrollen.

Die Verlaufskurve der Quotienten ist in Abb. 10 dargestellt.

β -Hydroxybutyrat/Acetacetat :

Wie oben schon erwähnt, fanden sich bei den Quotienten β -Hydroxybutyrat/Acetacetat keine deutlichen Unterschiede in allen Phasen. Jedenfalls fanden wir hier nach Laktatgabe eine Zunahme der Quotientenwerte bei beiden Gruppen (Tab. 8).

Abbildung 11 zeigt das Verhalten dieses Quotienten während der Perfusion.

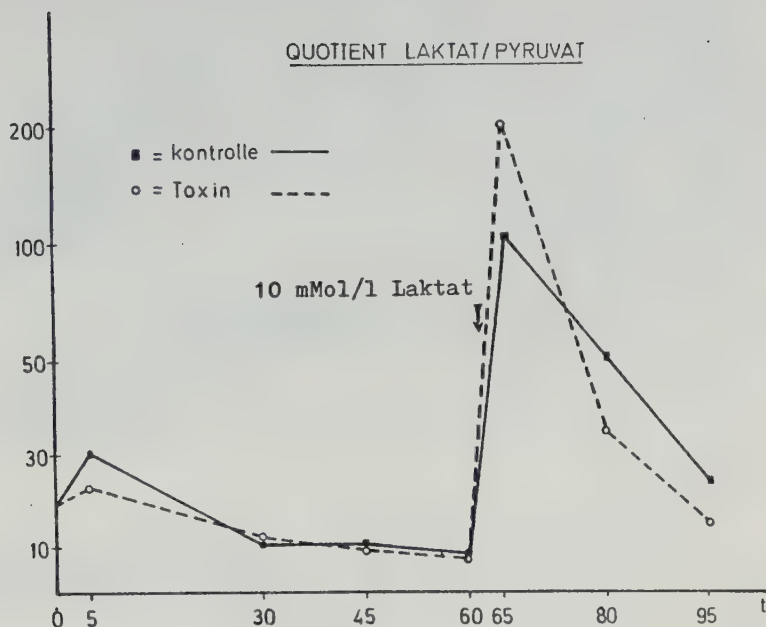


Abb. 10. Verhalten des Laktat/Pyruvat-Quotienten im Perfusat. Vergleich Toxin-Kontrolle.

Zeit	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
30. Min.	9	12,037	$\pm 7,915$	5	10,505	$\pm 2,186$	p = n.s.
45. Min.	9	9,460	$\pm 4,967$	6	10,040	$\pm 6,387$	p = n.s.
60. Min.	5	7,617	$\pm 5,339$	6	8,139	$\pm 3,487$	p = n.s.
80. Min.	9	35,280	$\pm 24,89$	6	52,657	$\pm 38,77$	p = n.s.
95. Min.	9	15,401	$\pm 6,341$	4	24,070	$\pm 10,16$	p < 0,1

Tab. 7. Laktat/Pyruvat-Quotienten des Perfusionsmediums in verschiedenen Perfusionsminuten.

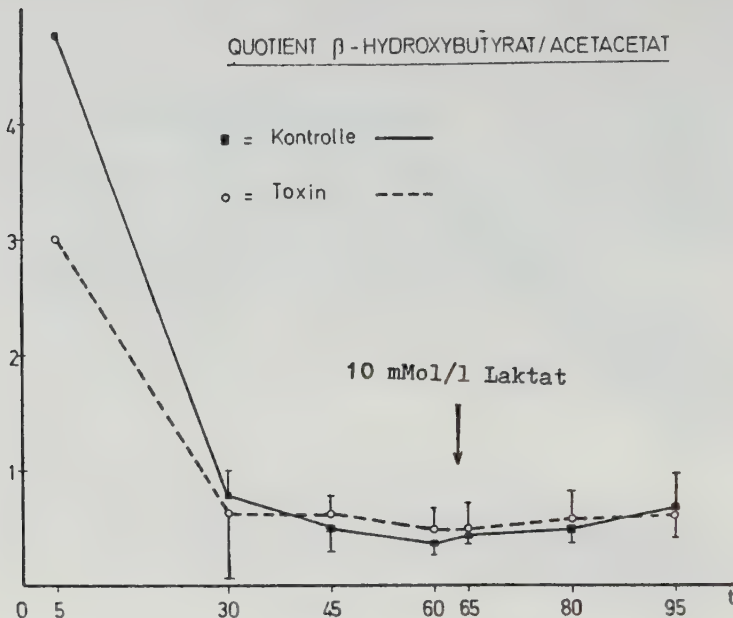


Abb. 11. β -Hydroxybutyrat/Acetacetat-Quotient im Perfusat während der Perfusionen.

Zeit	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
30.Min.	8	0,627 $\pm$ 0,750		6	0,769 $\pm$ 0,220		p = n.s.
45.Min.	8	0,616 $\pm$ 0,182		6	0,503 $\pm$ 0,227		p = n.s.
60.Min.	8	0,477 $\pm$ 0,188		6	0,360 $\pm$ 0,111		p = n.s.
80.Min.	8	0,563 $\pm$ 0,255		6	0,487 $\pm$ 0,118		p = n.s.
95.Min.	7	0,607 $\pm$ 0,235		6	0,667 $\pm$ 0,351		p = n.s.

Tab. 8. β -Hydroxybutyrat/Acetacetat-Quotienten im Perfusat in verschiedenen Perfusionsminuten. Vergleich Toxin - Kontrolle.

8. Enzymaustritt.

Die Messung der Enzymaktivitäten ergab keine wesentlichen Befunde.

Wie Abb. 12 zeigt, sind die Enzyme GOT und GPT bei der Toxingruppe vermehrt ins Perfusat ausgetreten. Dagegen fand sich bei der Toxingruppe eine verminderte Ausschüttung von MDH und GIDH gegenüber den Kontrollen. Die Unterschiede waren aber statistisch nicht zu sichern.

Die genauen Werte der Enzymausschüttung sind aus Tab. 9 ersichtlich.

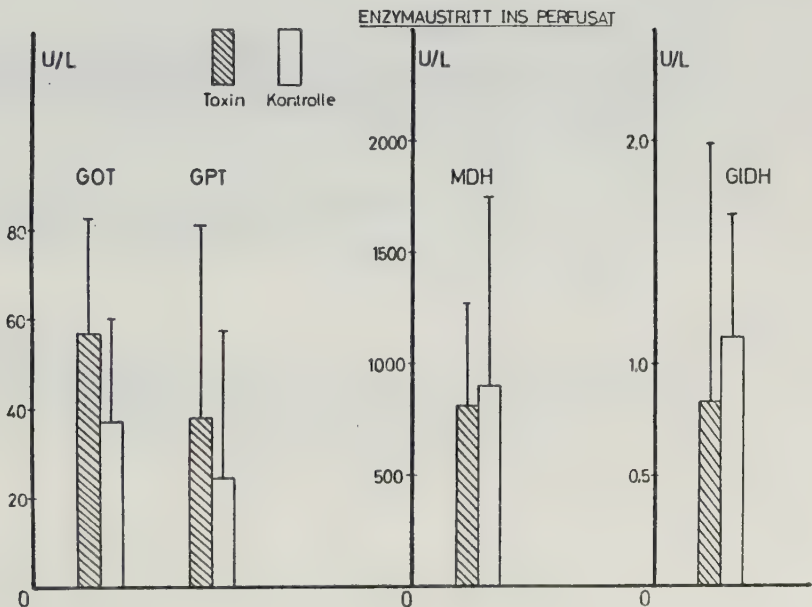


Abb. 12. Die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Perfusionsmedium während der Perfusion. Vergleich Toxin-Kontrolle.

	TOXIN			KONTROLLE			Signifikanz
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
GOT	7	56,785	$\pm 26,299$	4	37,250	$\pm 23,796$	p = n.s.
GPT	7	38,285	$\pm 42,917$	4	24,500	$\pm 32,295$	p = n.s.
MDH	7	814,14	$\pm 460,63$	4	903,25	$\pm 850,15$	p = n.s.
GLDH	7	0,828	$\pm 1,158$	4	1,125	$\pm 0,556$	p = n.s.

Tab. 9. Die Ausschüttung verschiedener Enzyme ins Perfusat (0. - 95. Perfusionsminute).
Vergleich Toxin-Kontrolle.
(Angaben in U/l).

9. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es bestand nur in der Phase nach Laktatgabe eine signifikant verminderte Aufnahme von Laktat und Pyruvat bei den Lebern mit Toxin behandelte Tiere gegenüber den Kontrollen.
2. Die Glukoseausschüttung ins Perfusat war in allen Phasen bei der Toxingruppe vermindert.
Die Minutenrate der Glukoseabgabe bei der Toxingruppe war während der endogenen Phase gegenüber der Kontrollgruppe um ein Drittel vermindert.
3. Die Glukoneogenese war bei den Lebern der Toxingruppe im Gegensatz zu den Kontrollen durch Laktatgabe nicht zu stimulieren.
4. Der Quotient aus Aufnahme von Laktat + Pyruvat und Abgabe von Glukose war nach Laktatgabe bei den Toxintieren signifikant höher als bei den Kontrollen.
5. Es fand sich bei den Lebern mit Toxin behandelte Tiere eine signifikant verminderte Synthese von Harnstoff.
6. Die Ketonkörperbildung bei den Toxintieren war ebenfalls in der endogenen Phase und Phase nach Laktatgabe reduziert. Hier konnte aber keine signifikante Differenz festgestellt werden.
7. Sowohl die extramitochondrialen als auch intramitochondrialen Redoxpaare (die Quotienten Laktat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetacetat) zeigten

keine signifikanten Unterschiede. Nur in der 95. Minute fand sich eine schwach signifikante Abnahme des Quotienten Laktat/Pyruvat bei der Toxin-
gruppe.

8. Die Messungen der Enzymaustritte (GOT, GPT, MDH, bzw. GLDH) ins Perfusat ergaben keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen.
9. Die erhaltenen Werte der Kontrollgruppe lagen im Bereich der in der Literatur angegebenen.
10. Tab. 10 zeigt zusammengefaßt die wesentlichen Ergebnisse wie oben genannt.

		TOXIN	KONTROLLE	
				SIGNIFIKANZ
Glukose	Vorperf.	1.408	1.695	P= nicht signifikant
	Endogen	0.355	0.515	P= nicht signifikant
	Nach Substrat	0.233	1.350	P < 0,01
Harnstoff	Vorperf.	0.247	0.256	P= nicht signifikant
	Endogen	0.074	0.217	P < 0,01
	Nach Substrat	0.073	0.136	P= nicht signifikant
<u>Lakt.+Pyru.</u> Glukose	Vorperf.	0.754	0.632	P= nicht signifikant
	Endogen	0.839	0.618	P= nicht signifikant
	Nach Substrat	4.349	1.349	P < 0,001

* Glukose u. Harnstoff in $\mu\text{Mol/g/min.}$

Tab. 10. Werte für Glukoseabgabe, Harnstoffsynthese und den Quotienten Laktat+Pyruvat-Aufnahme/Glukoseabgabe in den drei Perfusionsphasen.

E. DISKUSSION.

Die Diskussion um die Möglichkeit der Existenz eines oder mehrerer spezifischer "Verbrennungstoxine" nimmt heute bei der Forschung zur Verbrennungskrankheit eine bedeutende Stellung ein. 1948 beschrieb GREUER (21) die toxische Wirkung von Eiweißabbauprodukten, die aus verbrannter Haut von Ratten gewonnen wurden. Dieser Zerfallstoff war für Empfänger-mäuse in 75% der Fälle tödlich, sofern er eine Menge von mehr als 0,2 mg Gesamt-N enthielt.

BASSET et al (6) konnten 1950 am isolierten Froschherz eine stark toxische Wirkung von Extrakten aus kauterisierten Skelettmuskel feststellen. ALLGÖWER und SIEGRIST (2) berichteten 1957 über die Möglichkeit der Entstehung sogenannter Verbrennungstoxine. Die Existenz solcher toxischen Substanzen, die bei der Verbrennung in der normalen Haut gebildet werden, wurde dann von mehreren Autoren postuliert (12,19, 48, 49, 63, 64).

Von anderen Autoren wurde diese Hypothese auch abgelehnt. ANTOS et al. (4), HARRISON und BLALOCK (24) führten die ungenügenden Beweise für die Entstehung dieser toxisch wirkenden Substanz als Gegenargument an. KONRAD und KELLNER (28) erklärten 1949 auf Grund ihrer Untersuchungen bei der Behandlung von Verbrennungen mit sterilen Kompressionsverbänden und Penicillin, daß die Toxintheorie der Verbrennungen keineswegs mehr im Vordergrund steht. Sie beschrieben weiter, daß die meisten Todesfälle durch Verbrennungen, die sie früher nach dem dritten Tag gesehen haben, vermutlich zu Lasten der Infektionen gehen. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen schrieb GREUER 1950 (22), daß die Intoxikationstheorie durch Eiweißzerfallprodukte auch durch die Arbeit von KONRAD

und KELLNER in keiner Weise als widerlegt angesehen werden könnte, sondern, daß es notwendig sei, diese Vorstellung zur Basis einer rationellen Allgemeinbehandlung zu machen. REHN (47) konnte 1957 ein gemeinsames spezifisches Verbrennungstoxin in der Rest-N-Fraktion nicht nachweisen, dagegen fand er bei Verbrennungen eine Vermehrung der Amine und Peptide, vor allem in der Leber.

Wie eingangs beschrieben, gelang es in den letzten Jahren, aus verbrannter tierischer bzw. menschlicher Haut und aus dem Serum schwerverbrannter Patienten einen toxischen Lipid-Protein-Komplex zu isolieren (43, 56, 60), der auf Empfängertiere eine absolut letale Wirkung zeigte.

Die Frage, ob ein spezifisches Verbrennungstoxin die wesentliche Ursache dieser Verbrennungskrankheit sein kann, und welches Ausmaß die Auswirkung des Toxin auf den Gesamtorganismus hat, wurde von verschiedenen Autoren diskutiert. Nach dem heutigen Stand der Diskussionen nimmt man an, daß dieses Toxin eine generalisierte zellschädigende Wirkung hat. Diese Fragen bleiben aber bis heute noch offen.

Von Interesse ist schließlich, die Wirkung dieses isolierten, toxischen Lipid-Protein-Komplexes näher zu untersuchen, um die oben diskutierten Fragen einer Lösung näher zu bringen. In der vorliegenden Arbeit sollten daher Wirkungen eines solchen Toxins aufgezeigt werden, um eine eventuelle Übereinstimmung von Toxin und Verbrennungseffekten, die in der Literatur beschrieben wurden, darzustellen. Weiter sollte ein erster Einblick in Ansatzpunkt und Wirkungsmechanismus des Toxins versucht werden.

Organveränderungen bei Schwerverbrannten, vor allem solche der Leber, wurden bereits 1940 von ZINCK (73) beschrieben. BLÜTHGEN (9) bezeichnete 1944 auf Grund seiner Tierversuche die Leber als dasjenige Organ, das am empfindlichsten und am frühesten auf Hautverbrennungen reagierte. Veränderungen von Funktion und Morphologie der Leber nach Verbrennungen wurden auch von BEKHUM (7), REHN (47) 1957, KRÖNER (35) 1967 und SCHÖLMERICH (55) 1976 berichtet.

Bei radiographischen Untersuchungen zum Toxinnachweis in der Zelle fand KREMER (33) eine starke Anreicherung des Toxins in der Leberzelle. Auf Grund der oben genannten Überlegungen führten wir die in der Einleitung beschriebenen Versuche am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber durch.

Die bei unseren Untersuchungen erhaltenen Werte der Kontrollen lagen im Bereich der in der Literatur angegebenen (20,25,31,38,39,40,42,51,62,72), ebenso die zur Kontrolle der Perfusionsqualität dienenden Größen (20,50,51). Mit Ausnahme der Hämolysewerte fanden wir bei diesen Kontrollgrößen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden von uns untersuchten Gruppen.

Auch die Bestimmung von Enzymaktivitäten, Ketonkörperbildung und Redoxquotienten ergab keine wesentlich differierenden Befunde, so daß wir hier keine Beeinflußung dieser Stoffwechselfparameter durch das Toxin feststellen können.

Die Berichte der Literatur über die gestörten Syntheseleistungen der Leber nach Verbrennungen, vor allem die Störung des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels, sind bisher noch lückenhaft und teilweise uneinheitlich. Die Veränderungen des Leberstoffwechsels nach Gabe eines Verbrennungstoxins und deren

Ursachen sind besonders wenig bekannt.

Bei unserer Untersuchung fand sich eine verminderte Ausschüttung von Glukose ins Perfusat bei den Lebern mit Toxin behandelter Tiere. Nach einer standardisierten Hautverbrennung der Ratte wurde der gleiche Befund von SCHÖLMERICH (55) beschrieben, hier wurde auch die Untersuchung des Leberstoffwechsels am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber durchgeführt.

Ein Absinken des Gehaltes der Leber an Glukose und Fruktose wurde auch von MASTARI (37) im Leberhomogenisat der mit Verbrennungstoxin vorbehandelten Ratte gefunden. Nach Vergiftungen durch andere Toxine sind ähnliche Effekte beobachtet worden. Nach Untersuchungen von O. WIELAND, REITER und FISCHER (70) starben Ratten und Mäuse nach Phalloidin-Vergiftung in einem hypoglykämischen Koma.

Die hier von uns beobachtete Verminderung der Glukosebildung ist sicher keine Folge mangelnden Substratangebotes im Perfusat. Dies konnte durch ein hohes Laktatangebot verifiziert werden. Im Gegensatz zu den Kontrollen war die Glukoneogenese bei diesen Lebern durch Laktatgabe nicht zu stimulieren. Dementsprechend war der Quotient aus Aufnahme von Laktat + Pyruvat und Abgabe von Glukose bei den Lebern der Toxingruppe signifikant höher, obwohl die Aufnahme von Laktat und Pyruvat bei der Toxingruppe bereits signifikant geringer als bei den Kontrollen war. Dies spricht für eine eingeschränkte Umsetzung des aufgenommenen Laktats und Pyruvats zu Glukose, d.h. eine verminderte Bildung von Glukose bei den Lebern der Toxintiere gegenüber den Kontrollen.

Die Annahme, daß die vermehrte Ausschüttung von Glukose bei der Kontrollgruppe eine Folge vermehrten Austritts dieses Substrats bei der während der Perfusion auftretenden Hämolyse ist, ist unwahrscheinlich, wenn man den geringfügigen Prozentsatz auftretenden Hämolyse und den geringen Glukosegehalt der Erythrozyten im Vergleich zu dem gesamten Glukosegehalt im Perfusionsmedium betrachtet. Ursache dieser verminderten Glukosebildung müßte danach eine gestörte Funktion der Glukoseneubildung in der Leber sein.

In Übereinstimmung mit den Befunden von SCHÖLMEICH (55) bei Hautverbrennungen zeigten unsere Versuche wiederum eine reduzierte Harnstoffsynthese gegenüber den Kontrollen. Auch BEKHUM (7) fand 1951 nach Verbrennung an den Leberschnitten der Ratte eine verminderte Harnstoffbildung. 1957 beschrieben ALLGÖWER und SIEGRIST (2), daß die Zunahme von niedermolekularen N-haltigen Substanzen bei Verbrennung teils durch vermehrten Eiweißabbau, teils durch Störung der Desaminierung von Aminosäuren und durch Störung der Harnstoffsynthese in der Leber zustande kam, deren wichtigste Ursache die Hypoxie im Schock war. T. WIELAND und DOSE (71) konnten in der Leber weißer Mäuse eine deutliche Abnahme von Harnstoff und ATP während der Knollenblätterpilz-Vergiftung feststellen.

Um genauere Aufschlüsse über die verminderte Harnstoffbildung erhalten zu können, ist die Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren notwendig. Verschiedene Autoren berichteten nach Tierversuchen über einen erniedrigten Energiequotienten ATP/ADP und elektronenmikroskopische Befunde einer degenerativen Vakuolisierung der Mitochondrien nach Ver-

brennungen (35,55,73). Hier besteht wahrscheinlich ein enger Zusammenhang zwischen den gefundenen morphologischen Veränderungen der Leberzelle und dem erniedrigten Energiequotienten ATP/ADP.

Ein ähnlicher Befund wurde auch bei den Lebern der mit spezifischem cutanen Verbrennungstoxin vorbehandelten Tiere beobachtet (37). HERRMANN, GOSLAR und FETZER (26) fanden bei der histochemischen Untersuchung an der Rattenleber nach Verbrennung eine Aktivitätsverminderung der ATP-ase. Nach heutiger Auffassung spielt die ATP-ase eine wesentliche Rolle bei der oxydativen Phosphorylierung.

Es ist bekannt, daß die Enzyme der Biosynthese von Harnstoff, der oxydativen Phosphorylierung und der Atmungskette überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert sind, und die Mitochondrien als "Kraftwerke" der Zelle gelten. In den Mitochondrien vollzieht sich die Gewinnung von chemischer Energie in Form von ATP, die für die besonderen Zelleistungen benötigt wird, z.B. für Syntheseleistungen der Leber.

Aus den vorgenannten experimentellen Befunden lassen sich bereits einige Schlüsse über die Faktoren ziehen, die die Einschränkung der Syntheseleistung der Leber beeinflussen:

1. Man vermutet, daß das Toxin für die beschriebenen Veränderungen der Mitochondrien und für eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung mit der Folge einer Senkung des Energiequotienten ATP/ADP verantwortlich ist.
2. Wie Abb. 13 schematisch zeigt, werden 2 ATP-Moleküle für die Glukosebildung aus Laktat bzw. Pyruvat verbraucht, um ein Molekül Glukose zu gewinnen, ebenso 3 ATP-Moleküle für die Harnstoffsynthese.

Es ist also der Schluß erlaubt, daß das Toxin nur die Bildung von Stoffwechselprodukten, deren Biosynthese energiereicher Verbindungen bedarf, stark herabsetzt. Auf Grund dieser Ergebnisse waren die gefundenen, reduzierten Syntheseleistungen der Toxinlebern durch ATP-Mangel zu erklären.

Da sich also die bisher beschriebenen Veränderungen des Leberstoffwechsels nach Hautverbrennung durch intraperitoneale Gabe eines Verbrennungstoxins, das bei der Verbrennung in der normalen Haut gebildet wird, reproduzieren lassen, ist es möglich, dies Toxin als Ursache dieser Veränderungen bei Verbrennung zu betrachten.

Es ergeben sich also zusammenfassend zwei wesentliche Punkte:

1. Eine direkte Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch ein spezifisches cutanes Verbrennungstoxin.
2. Eine eingeschränkte Syntheseleistung der Leber als Folge einer gestörten oxydativen Phosphorylierung.

Wie bereits erwähnt, ist elektronenmikroskopisch eine Schädigung der Mitochondrien durch Wirkung des Toxins gefunden worden. Zweifelhaft bleibt noch der Weg des Toxins in die Zelle und Mitochondrien. Die Frage, ob das Toxin eine direkt schädigende Wirkung an den Zellmembranen hat oder unter Mitwirkung eines "Rezeptors" wirkt, wie in Abb. 14 veranschaulicht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Anschließend soll hier noch über die möglichen therapeutischen Konsequenzen kurz diskutiert werden. Bei der Behandlung von Verbrennungen ist die Verab-

reichung kalorienreicher Nährstoffe (z.B. Glukoseinfusionen) schon lange bekannt. Noch umstritten ist die Frage, ob die Behandlung der Verbrennungskrankheit durch Gabe eines Antitoxins möglich ist. Zahlreiche immunologische Therapieversuche wurden von verschiedenen Autoren beschrieben.

FEODOROV (17) hat 1962 im Tierversuch und am Menschen die Behandlung mit Rekonvaleszentenserum eingeführt. Nach tierexperimentellen Untersuchungen von STÄDTLER (67) konnten letal verbrannte Mäuse sowohl durch die aktive Immunisierung als auch durch Behandlung mit heterologem antitoxischen Serum weitgehend geschützt werden.

Eine Schutzwirkung sowohl der aktiven als auch der passiven Immuntherapie mit menschlichem Verbrennungstoxin oder dem entsprechenden antitoxischen IgG konnte bei tödlich verbrannten Tieren gezeigt werden. Die spezifische Schutzwirkung hängt quantitativ sowohl bei der aktiven wie auch bei der passiven IgG-Therapie vom Immunisierungsschema ab (60).

Von großem Interesse sind die von SCHOENENBERGER (61) 1976 beobachteten Befunde an Versuchsmäusen, denen zufolge Antikörper, die nicht gegen *Pseudomonas*keime, sondern gegen das spezifische Verbrennungstoxin gebildet werden, nicht nur gegen dieses Toxin schützen, sondern auch das Angehen der Infektion verhindern.

Nähere Untersuchungen sollen anhand dieser Ergebnisse an isolierten Hepatozyten durchgeführt werden, um die Klärung eines möglichen therapeutischen Ansatzes auf Grund der Toxinhypothese weiterzuführen.

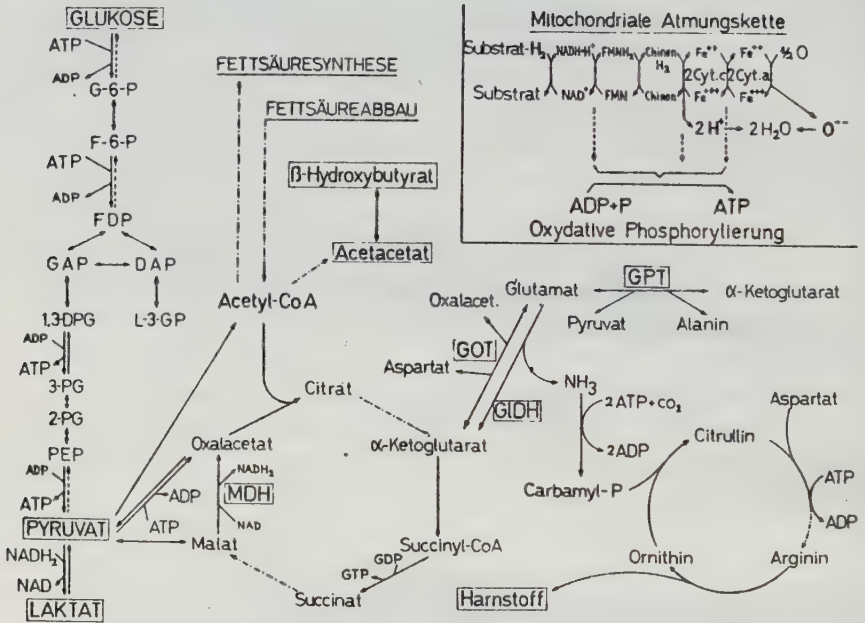


Abb. 13. Stoffwechselschema.

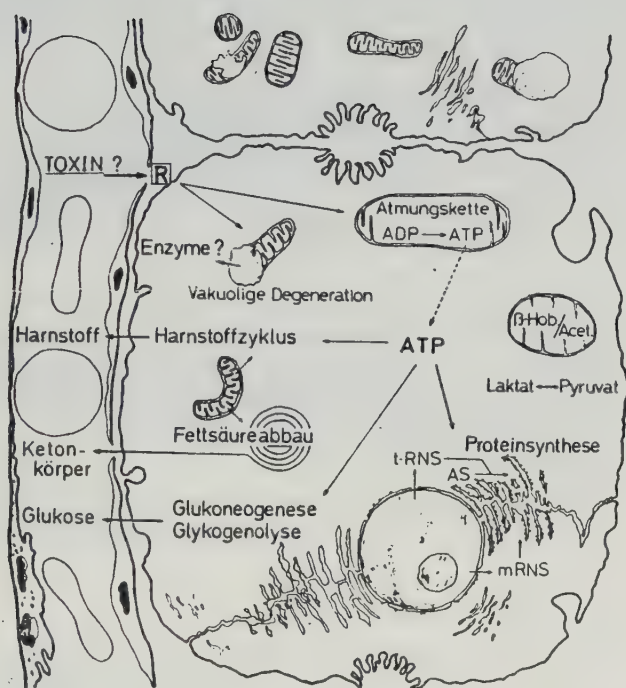


Abb. 14. Modell der Toxinwirkung auf die Zelle.

F. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Am Modell der isolierten, perfundierten Rattenleber wurden die Auswirkungen eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins auf den Leberstoffwechsel untersucht.

Die Untersuchungen wurden an 12 Toxintieren 5 Tage nach intraperitonealer Gabe (15mg/Ratte) eines Verbrennungstoxins (mit letal toxischer Wirkung auf Empfängermause) und an 7 Kontrolltieren (erhielten nur 2,5 ml physiol. Kochsalzlösung i.p.) durchgeführt.

Im Perfusionsmedium wurden Messungen von Glukose, Laktat, Pyruvat, Acetacetat, β -Hydroxybutyrat, Harnstoff und der Aktivität von GOT, GPT, MDH und GLDH durchgeführt. Es wurde versucht, die Veränderungen des Leberstoffwechsels nach Toxingabe einander zuzuordnen.

Die Ergebnisse zeigten folgende wesentliche Befunde:

Die Syntheseleistung von Glukose und Harnstoff bei den Lebern mit Toxin behandelten Tiere waren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen deutlich reduziert. Ebenso konnte die Glukoneogenese bei diesen Lebern durch Laktatgabe nicht stimuliert werden. Es kam hier zu einem signifikant erhöhten Quotienten aus Laktat und Pyruvat-Aufnahme und Abgabe von Glukose.

Die Redoxquotienten (Laktat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetacetat) und die Ketonkörperbildung waren ebenfalls reduziert, hier fanden sich jedoch keine

wesentlichen Unterschiede. Bei der Bestimmung von Enzymaustritten ins Perfusat konnten keine signifikanten Differenzen zwischen den Kollektiven beobachtet werden.

Aus den vorliegenden Untersuchungen der Leber nach Gabe eines Verbrennungstoxins lassen sich bereits folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Leber nach Verbrennungen lassen sich durch intraperitoneale Gabe eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins reproduzieren. Dies spricht dafür, daß eine direkte Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch dieses Toxin als gesichert anzusehen ist.
2. Die Veränderungen des Leberstoffwechsels lassen sich als Folge eines Energiedefizits interpretieren.
3. Es ist anzunehmen, daß das Verbrennungstoxin in erster Linie an den Strukturelementen der Zelle angreift, insbesondere an den Mitochondrien. Eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung mit Folge eines ATP-Mangels erscheint als wesentlicher Ansatzpunkt der Toxinwirkung.

Weitere Untersuchungen an isolierten Hepatozyten sollen weitere genauere Vorstellungen über die Wirkung und den Mechanismus des Toxins geben.

G. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
Cyt.	Cytochrom
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DPG	1,3-Diphosphoglycerat
FDP	Fruktose-1,6-diphosphat
F-6-P	Fruktose-6-phosphat
FMN	Flavinmononucleotid
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G6P-DH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
L-3-GP	L-3-Glycerophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hb	Hämoglobin
B-HBDH	B-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
B-HOB	B-Hydroxybutyrat
HK	Hexokinase
I.E.	Internationale Einheit
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
NAD	NAD ⁺ , Nicotinamidadeninucleotid
NADH ₂	NADH+H ⁺ , reduziertes NAD
NADP	NADP ⁺ , Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NADPH ₂	NADP+H ⁺ , reduziertes NADP
n.s.	nicht signifikant
PEP	2-Phosphoenolpyruvat
3-PG	3-Phosphoglycerat
R	Rezeptor
REM	Rasterelektronenmikroskopie
m-RNS	messenger-Ribonucleinsäure
t-RNS	transfer-Ribonucleinsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

H. LITERATUR

1. AVDAKOFF, V.:
Pathological Modification of Tissues by Burns.
St. Petersburg med. vestnik. 16, 4 (1876).
2. ALLGÖWER, M. und J. SIEGRIST:
Verbrennungen.
Berlin, Springer-Verlag (1957)
3. ALLGÖWER, M., C. BURRI, L. CUENI, F. ENGLE, U.F. GRUBER, H. FLEISCH, F. HARDER and R.G.G. RUSSELL:
Study of burn toxins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 150, 807 (1968)
4. ANTOS, R.J., R.M. DWORKIN and H.D. GREEN:
Shock associated with deep muscle burns.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 57, 11 (1944)
5. ARTURSON, G.:
Alkaline phosphatase activity in serum and hepatic tissue in burned rats.
Acta chir. Scand. 125, 612 (1963)
6. BASSET, A., F. DUCOUX et H. MARTINEAU:
Présence d' une substance cardio-dépressive dans des extraits de muscles brûlés de grenouille.
C.R. Soc. Biol. Paris, 144, 1048 (1950)
7. BEKHUM, D.W. and R.A. PETERS:
Observations upon a Change in an Enzymatic Process in Burns.
Quart. J. exp. Physiol. 36, 127 (1951).
8. BERGMAYER, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I und II.
Weinheim, Verlag Chemie (1974), 3. Auflage.

9. BLÜTHGEN, H.:
Beitrag zur Pathologie der Verbrennungen.
Frankf. Z. Path. 58, 85 (1943)
10. BRAUER, R.W., R.L. PESSOTTI und P. PIZZOLATO:
Isolate rat liver preparation. Bile production
and other basic properties.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 78, 174 (1951)
11. BÜCHER, Th. und M. KLINGENBERG:
Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organi-
sation.
Angew. Chemie 70, 552 (1958)
12. BURRI, C. und M. ALLGÖWER:
Die toxische Wirkung steriler, verbrannter Haut
bei Mäusen verschiedener Stämme.
Schweiz. med. Wschr. 94, 560 (1964)
13. CLAUSS, G. und H. EBNER:
Grundlagen der Statistik.
Frankfurt, Verlag Harri Deutsch (1972)
14. CUENI, L.B., M. ALLGÖWER und G.A. SCHOENENBERGER:
Isolierung und physikalisch-chemische Charakteri-
sierung eines Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut.
Z. ges. exp. Med. 156, 110 (1971)
15. DONATI L., G. FRANCESCONI, E. GENOVESE und P. ZANOLI:
Studio disleuni sistemi enzimatici nel plasma di
ratto ustionato.
Atti Accad.Med. Lombarda 19, 2 (1964)
16. FAHIMI, H.D.:
Perfusion and Immersion Fixation of Rat Liver with
Glutaraldehyde.
Lab. Invest. 16, 736 (1967)

17. FEODOROV, N.A. and S.V. SKURKOVICH:
Immunohemotherapy of Burn Sickness.
In: Arzt, C.P. (Hrsg), "Research in Burns",
Washington, American Inst. of Biol. Sciences
(1962), S. 266.
18. FETZER, S., M. HERRMANN und H.G. GOSLAR:
Histochemisches Verhalten einiger Fermentsysteme
der Leber unter experimentellen Bedingungen.
Anat. Anz. 115, 179 (1965)
19. FOX, C.:
Toxic thromboplastic extracts of skin.
J. Amer. med. Ass. 187, 655 (1964)
20. GLOGNER, P., H. NIETH und K. GLOEDE, H. WAGNER:
Perfusion der isolierten Rattenleber mit
Rinderblut: Kohlenhydratstoffwechsel, Syn-
these von Harnstoff und Plasmaprotein und
Verhalten des Blut ammoniakspiegels.
Klin. Wschr. 44, 1040 (1966)
21. GREUER, W.:
Studien zur Biologie und Therapie des Verbren-
nungsschadens. 1. Mitteilung.
Beiträge zur klin. Chir. 177, 213 (1948)
22. GREUER, W.:
Ist die Intoxikationstheorie der Verbrennung
als widerlegt zu betrachten?
Beiträge zur klin. Chir. 180, 493 (1950)
23. HARDER, F.:
Zur Charakterisierung der Toxine aus verbrannter
Mäusehaut.
Z. ges. exp. Med. 145, 209 (1968)
24. HARRISON, W.G. and A. BLALOCK:
A Study of the death following burns.
Annals of Surgery 96, 36 (1932)

25. HEMS, R., B.D. ROSS, M.N. BERRY and H.A. KREBS:
Gluconeogenesis in the Perfused Rat Liver.
Biochem. J. 101, 284 (1966)
26. HERRMANN, M., H.G. GOSLAR und S. FETZER:
Histochemische Untersuchungen an der Leber nach
Verbrennung.
Histochemie 4, 541 (1965)
27. KERNAHAN, D.A.:
Recent and current trends in burn research and
treatment.
Canad.med.Ass.J. 97, 433 (1967)
28. KONRAD, J. und H. KELLNER:
Unsere Erfahrungen über die Behandlung von Ver-
brennungen mit sterilen Kompressionsverbänden und
Penicillin.
Klinische Medizin, Wien, 4, 585 (1949)
29. KREBS, H.A. and HENSELEIT, K.:
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 210, 33 (1932)
30. KREBS, H.A.:
Die Ursachen der Ketonkörperanhäufung im tierischen
Organismus.
Naturwiss. Rundschau 20, 47 (1967)
31. KREBS, H.A.:
Formation of Ketone Bodies in the Perfused Rat Liver.
In: Staib, W, und R. Scholz (Hrsg.), "Stoffwechsel
der isoliert perfundierten Leber". Berlin, Springer-
Verlag (1968), S. 129.
32. KREBS, H.A.:
Gluconeogenesis and redox state.
Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 351, 288 (1970)

33. KREMER, B., H. FRENZEL, M. ALLGÖWER, K. STÄDTLER
und G.A. SCHOENENBERGER:
Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische
Untersuchungen eines spezifischen Verbrennungstoxins
und seine Auswirkung auf die Mäuseleber nach suble-
taler Verbrennung.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 59, 581 (1975)
34. KREMER, B., I.-E. RICHTER, H. FRENZEL, U. SCHÄFER,
K. STÄDTLER und G.A. SCHOENENBERGER:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines
spezifischen, aus menschlichem Serum isolierten
Verbrennungstoxins und seiner nicht toxischen
Vorstufe.
Microscopica acta 77, 420 (1976)
35. KRÖNER, H., E. MEINKEN und W. STAIB:
Adeninnucleotide und freie Aminosäuren in der
Rattenleber sowie Aminosäure - und Corticosteron-
spiegel im Serum von Ratten nach Verbrennungen.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 81 (1967)
36. LAING, J.E. und G.M.G. BARTON:
Serum enzyme levels in burned patients.
In: Wallace, A.B. and A.W. Wilkinson (Hrsg.), "Re-
search in Burns", Edinburgh and London, E&S. Living-
stone ltd, (1966), S. 98.
37. MASTARI, H.:
Wirkung eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins
auf Funktion und Morphologie der Rattenleber. Ver-
suche an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Dissertation Mainz 1977 (im Verfahren).
38. MENAHAN, L.A., B.D. ROSS and O. WIELAND:
Studies on the Mechanism of Fatty Acid and Glu-
cagon Stimulated Gluconeogenesis in the Per-
fused Rat Liver.
In: Staib, W. und R. Scholz (Hrsg.), "Stoffwechsel
der isoliert perfundierten Leber". Berlin, Springer-
Verlag (1968), S. 142.
39. MENAHAN, L.A. and O. WIELAND:
Interactions of Glucagon and Insulin on the Meta-
bolism of Perfused Livers from Fasted Rats.
European J. Biochem. 9, 55 (1969).

40. MIERTSCH, H.J. und L. RÖKA:

Ammoniakverwertung und Harnstoffsynthese der isoliert perfundierten Rattenleber.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 416 (1972)

41. MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON and W.F. BALE:

The Dominant role of the liver in plasma protein synthesis.

J.exp.Med. 94, 431 (1951)

42. MILLER, L.L.:

Direct actions of insulin, glucagon and epinephrine on the isolated perfused rat liver.

Fed. Proc./^{Fed.}Amer. Soc. Exp. Biol. 24, 737 (1965)

43. MÜLLER, W., K. STÄDTLER, M. ALLGÖWER und G.A. SCHOENENBERGER:

Biological properties of a burn toxin isolated from human skin after thermal injuries in vitro.

In: Abstracts of the 7th Congress of the Europ. Soc.exp.Surg., Amsterdam (1972), S. 298.

44. PHILLIPS, A.W. and O. COPE:

An Analysis of the Effect of Burn Therapy on Burn Mortality.

In: Artz, C.P. (Hrsg.) "Research in Burns", Washington, Amer. Inst. Biol. Sciences and Oxford, Blackwell Scien. Publications (1962), S.1.

45. PHILLIPS, A.W.:

Burn Therapy: V. Disaster Management to Treat or Not to Treat? Who Should Receive Intravenous Fluids?

Annals of Surgery 168, 986 (1968)

46. RAMIREZ, A.T., C.T. TAMONDONG, A.N.L. DEL CASTILLO and B.R. DINO:

Probit analysis of burn deaths in a developing country.

Surgery 68, 813 (1970)

47. REHN, J.:

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der Verbrennungskrankheit I. & II. Mitteilung.

Arzneimittel-Forschung 7, 637-649 (I), 721-725 (II) (1957)

48. ROSENTHAL, S.R.:

Substances released from the skin following thermal injury.

Surgery 46, 932 (1959).

49. ROSENTHAL, S.R., G.T. CROUSE and W.A. SPURRIER:

The Neutralization of Burn Toxin from Human Skin

In: Wallace, A.B. and A.W. Wilkinson (Hrsg.),
"Research in Burns", Edinburgh and London, E.&S.
Livingstone Ltd. (1966), S. 439.

50. SCHIMASSEK, H.:

Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetisk medium and control of liver function.

Life Sc. 11, 629 (1962).

51. SCHIMASSEK, H.:

Der Status des energieliefernden Stoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber.

Habilitationsschrift Marburg, Görich & Weiershäuser, (1963)

52. SCHMIDT, E., F.W. SCHMIDT, C. HERFARTH, K.H. DETTMAR und H. FABEL:

Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der isolierten, perfundierten Ratten-Leber. II. Mitteilung: Untersuchungsmethoden und Studien über Wahl des Perfusionsmediums und Vergleichbarkeit der Enzym-Muster verschiedener Leberlappen.

Enzym. biol. clin. 7, 167 (1966)

53. SCHMIDT, E., F.W. SCHMIDT, C. HERFARTH, K. OPITZ und W. VOGEL:

III. Mitteilung: Analyse des bei Perfusion unter Hypoxie entstehenden extracellulären Enzym-Musters.

Enzym. biol. clin. 7, 185 (1966)

54. SCHMIDT K.:

Veränderungen der molekularen Struktur der Haut unter der Einwirkung thermischer Energie und ihre Bedeutung für das Verbrennungssyndrom.

Habilitationsschrift, Tübingen (1977), im Verfahren.

55. SCHÖLMEIERICH, J.:

Die Wirkung einer standardisierten Hautverbrennung an der Ratte auf den Leberstoffwechsel. Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber.

Vortrag auf der Jahrestag. der Dtsch. Ges. f. Anäst. u. Wiederbelebung 1976, Travemünde, im Druck.

56. SCHOENENBERGER, G.A., P. MATTER und M. ALLGÖWER:

Isolation of a toxic substance from mouse skin after severe burn.

Excerpta Medica (Amsterdam) International Congress 190, 119 (1969)

57. SCHOENENBERGER, G.A., U. BAUER, L.B. CUENI, U. EPPENBERGER und M. ALLGÖWER:

Isolation and characterization of a cutaneous lipoprotein with lathal effects produced by thermal energy in mouse skin.

Biochem.biophys.Res.Comm. 42, 975 (1971)

58. SCHOENENBERGER, G.A., L.B. CUENI, U. BAUER, U. EPPENBERGER und M. ALLGÖWER:

Isolation and characterization of a toxic lipid-protein complex formed in mouse skin by controlled thermal energy.

Biochem.Biophys. Acta (Amst), 263, 149 (1972)

59. SCHOENENBERGER, G.A., U. BAUER, L. B. CUENI, K. STAEDTLER und M. ALLGÖWER:

Physical, chemical and biological properties of a specific toxic lipid-protein complex formed in thermally altered mouse skin.

Biochem. Biophys. Acta (Amst) 263, 164 (1972)

60. SCHOENENBERGER, G.A., M. ALLGÖWER, F. BURKHART, W. MÜLLER, K. STÄDTLER und P. ZELLNER:

Pathogenetische Bedeutung eines spezifischen kutanen Verbrennungstoxins für Infektion und Spätmortalität nach schweren Verbrennungen.

Zentralblatt f. Chir. 99, 1089 (1974).

61. SCHOENENBERGER, G.A., M. ALLGÖWER, B. KREMER und K. STÄDTLER:
Neue Gesichtspunkte zur Verbrennungskrankheit.
Chirug 47, 582 (1976)
62. SCHOLZ, R.:
Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.
In: Staib, W. und R. Scholz (Hrsg.) "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber", Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1968), S.25-52.
63. SEVITT, S.:
Toxaemia of Burns.
Modern Trends in Plastic Surgery 2, 126 (1966)
64. SHUN-SCHINELLA, C.K., J.W. STANFORD, J. GREENBERG, F.J. ANNECCHIARICO and C.L. FOX jr.:
Toxic factors and proteolytic enzymes in burns.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 150, 816 (1968)
65. SPECTOR, A.A. und W.A. PAULI:
Early changes in Serum enzymes in the rat following burn trauma.
J. appl. Physiol. 18, 818 (1963)
66. STÄDTLER, K., M. ALLGÖWER, L.B. CUENI und G.A. SCHOENENBERGER:
Pathophysiologische Untersuchungen an einem Verbrennungsmodell der Maus.
Res. exp. Med. 158, 23 (1972).
67. STÄDTLER, K., M. ALLGÖWER, L.B. CUENI und G.A. SCHOENENBERGER:
Immuntherapeutische Untersuchungen mit Verbrennungstoxin am Modell der Maus.
Res. exp. Med. 158, 34 (1972)

68. TRUSS, F.:
Nierenstoffwechselveränderungen bei Hautverbrennungen.
Med. Welt 19, 1845 (1968)
69. WARBURG, O.:
Wasserstoffübertragende Fermente.
Berlin, Verlag Dr. W. Sängner (1948)
70. WIELAND, O., H.E. FISCHER und M. REITER:
Über den Wirkungsmechanismus des Knollenblätterpilzgiftes α -Amanitin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path u. Pharma. 215, 75 (1952).
71. WIELAND, T. und K. DOSE:
Zur Biochemie der Knollenblätterpilz-Vergiftung.
Biochem. Zeitschr. 327, 345 (1956)
72. WILLMS, B. und H.D. SÖLING:
Regulation der Gluconeogenese durch Fettsäureoxydation in der isoliert perfundierten Rattenleber.
In: Staib, W. und R. Scholz (Hrsg.) "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber", Berlin, Springer-Verlag (1968), S. 118-128.
73. ZINK, K.H.:
Pathologische Anatomie der Verbrennung.
Veröff. a.d. Konstitutions- und Wehrpathologie 46, 89-108, Jena, Gustav Fischer Verlag (1940)

LEBENS LAUF

Am 24. August 1946 wurde ich, Setiadi HERMAWAN, als Sohn des Kaufmanns HONG, Tiauw Goan und seiner Ehefrau Hoat Lie, geb. Oey in Bandung/Indonesien geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bandung trat ich 1960 in die Christliche Oberschule ein und legte 1967 die Reifeprüfung an dieser Schule ab.

Von 1968 bis 1969 studierte ich Architektur an der Technischen Fakultät der "Katholischen Universität Parahyangan" in Bandung.

Am 18. November 1969 heiratete ich Frä. Tjendrawati Kurniawan, die zur Zeit als Assistenzärztin tätig ist. Um Medizin zu studieren, kam ich am 25.12.1969 in die Bundesrepublik Deutschland und besuchte das Staatliche Studienkolleg an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich am 25.3.1971 die Prüfung zur Feststellung der Hochschulreife ablegte.

Ich studierte ein Semester Physik und wechselte dann ab Winter-Semester 1971/72 zum Studium der Human-Medizin an der Universität Mainz über.

Im September 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im März 1974 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im März 1976 legte ich den I.Abschnitt und im August 1977 den II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Vom 1.10.1977 - 30.9.1978 leistete ich das Praktische Jahr im St. Hildegardis Krankenhaus in Mainz ab.

Im Oktober 1978 legte ich den schriftlichen Teil und mündlichen Teil des III.Abschnitts der Ärztlichen Prüfung ab.

Seit März 1979 bin ich als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des St.Vinzenz-Hospitals¹ Wiedenbrück tätig.

